

Über den Abbau der aromatischen Aminosäuren im Tierkörper nach Versuchen am Normalen und am Alkaptonuriker.

III. Mitteilung.

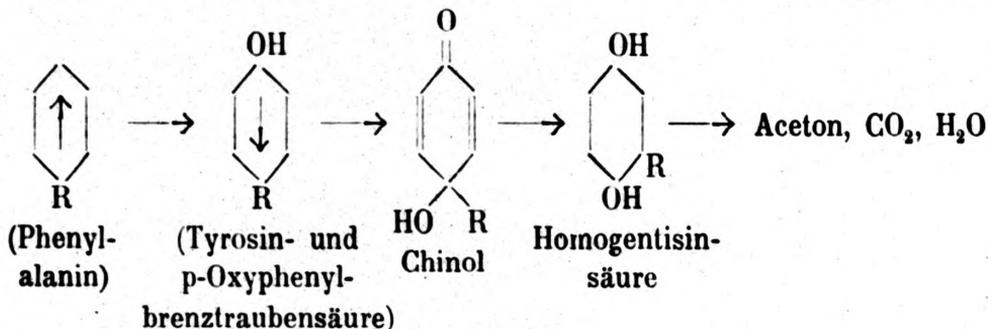
Von

Konrad Fromherz und Leo Hermanns.

(Aus der medizinischen Universitäts-Poliklinik in Freiburg i. B.)

(Der Redaktion zugegangen am 6. April 1914.)

In den beiden Mitteilungen über den Abbau des m-Methylphenylalanins im Organismus¹⁾ haben wir bereits versucht, über den Abbaumechanismus des Benzolkerns einigen Aufschluß zu gewinnen. Wir hatten damit begonnen, weitere experimentelle Tatsachen zu sammeln, um das von O. Neubauer²⁾ aufgestellte Abbauschema umfassender zu begründen und, wenn nötig, zu erweitern. Dieses Schema fordert bekanntlich, daß das Phenylalanin zunächst in Tyrosin und durch Oxydation der Seitenkette in p-Oxyphenylbrenztraubensäure übergeführt wird, und daß dann die letztere auf dem Wege über das entsprechende Chinol zu Homogentisinsäure und weiter zu den letzten Stoffwechselendprodukten abgebaut wird. Diese Hypothese enthält bezüglich des Orts des Angriffs der Oxydationen am Kern zwei prinzipielle Annahmen: Zunächst soll durch Oxydation in p-Stellung zur Seitenkette eine OH-Gruppe ein-



¹⁾ L. Böhm, Über den Abbau des m-Methylphenylalanins im Organismus, Diese Zeitschrift, Bd. 89, S. 101, und Med. Dissertation, Freiburg 1914. — K. Fromherz und L. Hermanns, desgl. II. Mitteilung, Diese Zeitschrift, Bd. 89, S. 113 (1914).

²⁾ O. Neubauer, D. Arch. f. klin. Med., Bd. 95, S. 211 (1909).

treten, wodurch der Abbau des Phenylalanins zu denselben Produkten wie der des Tyrosins führen müßte. Dieses primär gebildete p-Oxyderivat würde dann zweitens durch weitere Oxydation in ein Hydrochinonderivat übergeführt werden, wobei der Benzolkern vorübergehend einen chinoiden Charakter annehmen müßte unter Bildung eines Zwischenprodukts von der Konstitution der von Bamberger entdeckten Chinole.

Wir haben in Gemeinschaft mit L. Böhm in den beiden vorangehenden Mitteilungen festgestellt, daß das m-Methylphenylalanin zu gleichen Bruchteilen im Organismus verbrannt wird, wie das von Dakin¹⁾ sowie Dakin und Wakemann²⁾ verfütterte p-Methylphenylalanin. Diese Versuche lassen eigentlich nur Schlüsse zu der ersten, durch die Neubauersche Hypothese aufgeworfenen Frage zu, zu der primären Oxydation in p-Stellung zur Seitenkette. In Übereinstimmung mit den Versuchen von Dakin scheint auch aus unsern Versuchen hervorzugehen, daß diese erste Annahme unrichtig ist, daß also die p-Stellung für die Oxydation des Benzolkerns im Organismus nicht prädisponiert ist.

Wie wir aber am Schluß unserer zweiten Mitteilung erörtert haben, halten wir eine solche Folgerung für zu weitgehend, da zahlreiche Beispiele dafür bekannt sind, daß im Organismus aus den verschiedensten aromatischen Substanzen p-Oxyderivate entstehen, daß der Organismus also die Oxydation in p-Stellung bevorzugt, wodurch gewöhnlich eine Entgiftung oder eine bessere Harnfähigkeit der Substanz erreicht wird (vgl. Blum³⁾). Ferner gelang es kürzlich Embden und Baldes, direkt den Übergang von Phenylalanin in Tyrosin nachzuweisen.⁴⁾ Wir haben deshalb eine zweite Möglichkeit der Erklärung unserer Versuchsergebnisse herangezogen und angenommen, daß nicht nur eine p-ständige, sondern auch eine in m-Stellung zur Seitenkette befindliche Methylgruppe den normalen Vorgang der p-Oxydation zu hemmen imstande ist,

¹⁾ Dakin, Journ. of biol. Chem., Bd. 8, S. 11.

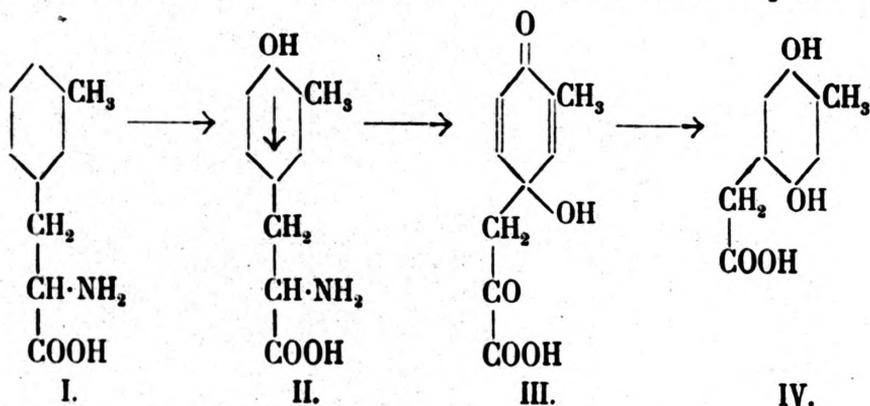
²⁾ Dakin und Wakemann, ebenda, Bd. 9, S. 139.

³⁾ Blum, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmak., Bd. 59, S. 269 (1908).

⁴⁾ H. Embden u. Baldes, Biochem. Zeitschrift, Bd. 55, S. 301 (1913).

daß deshalb bei beiden isomeren Methylphenylalaninen in gleicher Weise der normale Abbau gestört ist und damit bei beiden die Verbrennung auf einem andern Wege erfolgt, der weniger vollkommen zum Ziele führt.

Um eine Entscheidung zwischen diesen beiden Erklärungsmöglichkeiten zu erleichtern, waren Versuche am Alkaptonuriker



geeignet. Wenn das m-Methylphenylalanin (I) auf dem von O. Neubauer aufgestellten Abbauweg über das m-Methyl-p-tyrosin (II) zerstört wird, dann müßte es beim Alkaptonuriker eine Alkaptonsäure, eine Methylhomogentisine (IV) liefern können. Ist der Abbau jedoch nur auf einem andern Wege möglich, dann ist beim Alkaptonuriker zwar eine Verbrennung, aber keine Vermehrung der Alkaptonausscheidung zu erwarten.

I. Verhalten des p- und m-Tolylalanins beim Alkaptonuriker.

Wir haben zu unsern Versuchen den Alkaptonuriker benützt, den der eine von uns¹⁾ seinerzeit beschrieben und damals schon zu Stoffwechselversuchen benützt hat. Zunächst wiederholten wir zum Vergleich den Versuch Dakins und gaben dem Alkaptonuriker p-Tolylalanin.

Der Stickstoff wurde in der üblichen Weise nach Kjeldahl, die Homogentisine durch Titration mit $\frac{n}{10}$ -Silbernitratlösung unter Verwendung von 10%igem Ammoniak nach Baumann und Garrod bestimmt.²⁾³⁾ Die Aminosäure wurde nach der

¹⁾ K. Fromherz, Über Alkaptonurie, Med. Dissertation, Freiburg 1908.

²⁾ Baumann, Diese Zeitschrift, Bd. 16, S. 268 (1892).

³⁾ Garrod u. Hurthley, Journ. of Physiology, Bd. 35, Nr. 3 (1907).

Vorschrift von Dakin durch Kondensation von p-Tolylaldehyd mit Hippursäure, Reduktion und Spaltung des Reduktionsproduktes mit Salzsäure gewonnen. Die Resultate des Versuchs sind aus Tabelle I ersichtlich:

Tabelle I.

Datum	Harnmenge	N %	N pro die	Hs. %	Hs. pro die	Hs. : N (N = 100)	
I. 7./8. IV.	1800	0,704	12,7	0,396	7,06	55,7	
II. 8./9.	3000	0,617	18,5	0,309	9,27	50,1	
III. 9./10.	3600	0,619	22,3	0,309	11,12	50,0	
IV. 10./11.	2500	0,742	18,3	0,340	8,54	46,5	16 g p-Methylphenylalanin
V. 11./12.	3700	0,598	23,0	0,290	10,73	46,6	

Aus dem Konstantbleiben bzw. leichten Absinken des Verhältnisses Hs : N am Versuchstag trotz der sehr reichlichen Dose von 16 g p-Tolylalanin geht eindeutig hervor, daß diese Aminosäure nicht imstande ist, bei der Verfütterung an den Alkaptonuriker in eine Alkaptonsäure überzugehen. Das Resultat Dakins, der 5 g der Aminosäure verfütterte, ist demnach auch bei wesentlich höheren Dosen zu bestätigen.

In einem zweiten Versuch gaben wir das isomere m-Tolylalanin, das wir nach der Vorschrift dargestellt haben, die in der ersten Mitteilung¹⁾ niedergelegt ist. Der Patient bekam bei diesem Versuch eine leichte, relativ stickstoffarme Kost:

Morgens: 1 Tasse Kakao, 2 Semmeln. 10 Uhr: (2 Tassen) $\frac{1}{2}$ l Milch, 1 Semmel. Mittags: 1 Teller Schleimsuppe, 100 g Fleisch, Gemüse und Kompott. 3 Uhr: $\frac{1}{2}$ l Milch, 1 Semmel. 5 Uhr: $\frac{1}{4}$ l Milch. Abends: Mehlspeise mit Kompott.

Die Bestimmung der Homogentisinsäure und des Stickstoffs geschah wie oben. Gleichzeitig wurden zur Kontrolle der Verbrennung der eingeführten Aminosäure die ätherlöslichen Säuren bestimmt. Dazu wurde der Harn mit 10%iger Schwefelsäure angesäuert, im Vakuum auf etwa $\frac{1}{5}$ seines Volums eingengt, dann 5 mal mit der gleichen Menge Äther ausgeschüttelt und noch 2 Tage mit dem Kutscher-Steudel-

¹⁾ L. Böhm, a. a. O.

schen Apparat extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte wurden abdestilliert, der Rückstand in Wasser gelöst, auf ein rundes Volumen verdünnt und davon ein aliquoter Teil mit $n/10$ -Natronlauge titriert (Indikator: Phenolphthalein). In der Tabelle II sind die Mengen $n/1$ -Natronlauge angegeben, die der Tagesmenge der ätherlöslichen Säuren entsprechen.

Tabelle II.

Datum	Harn- menge	Spez. Gew.	N %	N pro die	Hs. %	Hs. pro die	Hs. : N (N=100)	Äther- lösliche Säuren ccm $n/1$ -NaOH	
I. 13./14. IV.	1800	1019	0,89	16,0	0,403	7,25	45,3	61,0	
II. 14./15.	1450	1025	1,12	16,3	0,536	7,77	47,6	61,0	
III. 15./16.	1950	1017	0,73	14,2	0,330	6,44	45,3	61,0	
IV. 16./17.	1200	1025	1,16	13,9	0,598	7,20	51,9	54,0	} Dimethyl- chinol per os
V. 17./18.	1550	1021	0,88	13,6	0,464	7,20	52,9	42,8	
VI. 18./19.	2900	1013	0,56	16,3	0,247	7,17	44,0	51,5	} 4 × 4,0 g m-Methyl- phenylalanin per os
VII. 19./20.	1900	1020	0,86	16,3	0,474	8,90	54,6	66,0	

Am 6. Tage der Tabelle II wurden 16 g der Aminosäure per os verabreicht. Auf den am 4. Tag angestellten Versuch werden wir unten zurückkommen. Die übrigen Tage sind Normaltage. Von der ersten Vorperiode wurden zur Bestimmung der ätherlöslichen Säuren die Tagesmengen, resp. je $\%_{10}$ derselben vereint verarbeitet. Die Werte der Tabelle sind die auf die einzelnen Tagesmengen berechneten Durchschnittswerte.

Das Absinken der Quotienten Hs:N am 6. Versuchstag zeigt deutlich, daß die zugelegte Aminosäure nicht die mindeste Vermehrung der Alkaptonsäuren verursacht hat, während der Stickstoff entsprechend der hohen Dose von 16 g m-Methylphenylalanin an diesem Tag etwas ansteigt. Die ausgeschiedenen ätherlöslichen Säuren sind aber an dem Versuchstage ebensowenig vermehrt wie bei dem von L. Böhm am Normalen angestellten Versuch, woraus der Schluß zu ziehen ist, daß der Alkaptonuriker diese aromatische Aminosäure genau wie der Normale so gut wie vollständig verbrannt hat.

Das m-Methylphenylalanin verhält sich demnach auch beim Alkaptonuriker genau wie die entsprechende p-Verbindung, es

verfällt der fast völligen Verbrennung, ohne eine Alkaptonsäure zu liefern. Dies ist um so merkwürdiger, als der Theorie entsprechend aus der m-Verbindung unschwer eine Methylhomogentisinsäure hätte entstehen können, während bei dem p-Tolylalanin Dakins die Methylgruppe die Oxydation nach dem Neubauerschen Schema verhindern konnte. Es zeigt sich in diesem Versuch, daß auch die Methylverbindung, die nach der Theorie den Weg über das Chinol gut eingehen konnte, trotzdem in anderer Weise abgebaut wird.

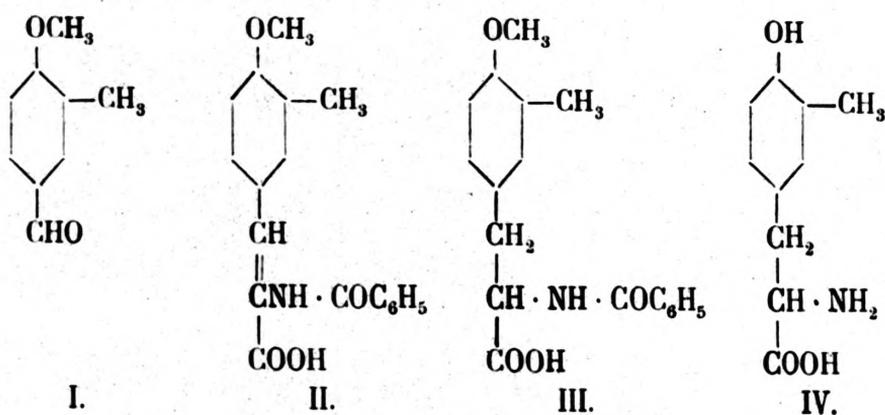
Das unerwartete Ergebnis dieses Versuchs am Alkaptonuriker konnte nun andererseits zugunsten unserer Erklärung des Verhaltens der beiden isomeren Tolyllanine beim Normalen verwertet werden. Hatten wir doch bereits angenommen, daß auch die Methylgruppe in m-Stellung die primäre Einführung der Hydroxylgruppe in die p-Stellung verhindern könnte. Die p-OH-Gruppe bildet aber die Bedingung für die weitere Umwandlung in ein Hydrochinonderivat (homologe Homogentisinsäure). Man könnte deshalb wegen des negativen Ausfalls des Versuchs am Alkaptonuriker zu dem Schlusse geneigt sein, daß eine derartige Oxydation in p-Stellung bei dem m-Methylphenylalanin nicht eingetreten ist. Dieser Schluß läßt sich als berechtigt erweisen, wenn wir zunächst die p-Hydroxylierung des m-Tolylalanins im Reagenzglas vornehmen und erst die so gewonnene Aminosäure verfüttern. Wird dann, aus einem p-Oxy-m-Methylphenylalanin oder m-Methyltyrosin, ein Hydrochinonderivat gebildet, dann war nur die Verhinderung der p-Oxydation durch die benachbarte Methylgruppe der Grund des andersartigen Abbaues des m-Methylphenylalanins beim Alkaptonuriker.

Aus diesem Gedankengang heraus haben wir das m-Methyltyrosin dargestellt und sein Verhalten beim Normalen und beim Alkaptonuriker geprüft.

II. Darstellung und Verfütterung des p-Oxy-m-Methylphenylalanins (m-Methyltyrosins).

Als Ausgangsmaterial benützten wir den p-Methoxy-m-Methylbenzaldehyd (I), den wir nach der Vorschrift von Gatter-

mann¹⁾ durch Einwirkung von wasserfreier Blausäure auf o-Kresolmethyläther bei Gegenwart von Aluminiumchlorid darstellten. Durch Kondensation dieses Aldehyds mit Hippursäure und Lösen des Azlactons in verdünnter Lauge erhält man p-Methoxy-m-Methyl-benzoylaminozimmtsäure (II), die durch Reduktion mit Natriumamalgam p-Methoxy-m-Methyl-benzoylphenylalanin (III) liefert. Aus dieser Substanz läßt sich leicht durch Jodwasserstoffsäure die Methoxylgruppe sowie die Benzoylgruppe abspalten, wodurch man zu dem gewünschten m-Methyltyrosin gelangt (IV).



1. p-Methoxy-m-Methyl-benzoylaminozimmtsäure: 7 Teile Hippursäure, 5 Teile p-Methoxy-m-methylbenzaldehyd, 3,5 Teile Natriumacetat und 13 Teile Essigsäureanhydrid wurden in der mehrfach beschriebenen Weise durch Erwärmen im Wasserbad kondensiert. Nach 20 Minuten ist die vorübergehend verflüssigte Masse wieder fest geworden und wird nach dem Erkalten mit wenig Wasser angerieben und auf der Nutsche abgesaugt. Das auf der Nutsche durch Waschen mit heißem und kaltem Wasser sowie verdünntem Alkohol gereinigte Azlacton wird sofort in verdünnter Natronlauge aufgeschwemmt und auf dem Wasserbad in Lösung gebracht. Nach dem Erkalten der Lösung wird filtriert und das Filtrat angesäuert. Die ausfallende p-Methoxy-m-methyl-benzoylaminozimmtsäure wird nach Stehen über Nacht abgesaugt und getrocknet; sie wird aus heißem Aceton unter Zusatz von der doppelten bis dreifachen Menge heißem Wasser umkrystallisiert, wobei sie sich sofort in schönen

¹⁾ Gattermann, Ber. d. D. chem. Ges., Bd. 31, S. 1150.

langen Nadeln ausscheidet, die bei nochmaligem Umkrystallisieren unter Zusatz von etwas Tierkohle leicht rein weiß zu erhalten sind. Fp. 246°. Ausbeute: 70% der Theorie.

6.956 mg Substanz gaben 296 cmm N bei 20° und 701 mm.¹⁾

$C_{19}H_{17}NO_4$ berechnet: N = 4,51%

gefunden: N = 4,46%

2. p-Methoxy-m-Methyl-benzoylphenylalanin: 10 g der eben beschriebenen ungesättigten Säure werden mit einem Überschuß (70—80 g) 3%igen Natriumamalgams reduziert, wobei man das Amalgam portionenweise unter Schütteln innerhalb einer halben Stunde zu der Aufschwemmung der Säure in Wasser zusetzt. Nach 20 Minuten ist alles gelöst, nach 35 Minuten wird vom Quecksilber abgetrennt und filtriert, das Filtrat (ohne vorheriges Kochen mit konzentrierter Lauge) angesäuert, wobei die reduzierte Säure als weiche Masse ausfällt. Nach Stehen über Nacht wird die wässrige Lösung abgegossen und das abgeschiedene Reaktionsprodukt im gleichen Gefäß in 15 (!) ccm heißem Eisessig gelöst. Die Eisessiglösung wird ohne Filtrieren in einem kleinen Kölbchen gesammelt, sie scheidet beim Erkalten im Eisschrank die gesättigte Säure schon in recht reiner Form, in fast weißen Blättchen ab und erstarrt zu einem Krystallkuchen. Nach dem Absaugen und Waschen mit Essigsäure in absteigenden Konzentrationen und schließlich mit Wasser erhält man eine bei 146° schmelzende Substanz, die zur Weiterverarbeitung auf m-Methyltyrosin genügend rein ist. Bei nochmaligem Umkrystallisieren aus heißem Alkohol und Wasser steigt der Schmelzpunkt auf 148—149°. Ausbeute 60—70% der Theorie.

I. 0,1526 g Substanz gaben 0,3845 g CO₂ und 0,0697 g H₂O.

II. 0,2833 „ „ „ 11,9 ccm N bei 22° und 742 mm Druck.

$C_{18}H_{19}NO_4$ berechnet: C = 68,97%, H = 6,13%, N = 4,47%

gefunden: I. C = 68,71%, H = 6,48% —

II. — — N = 4,62%

3. p-Oxy-m-methyl-phenylalanin (m-Methyltyrosin): 10 g p-Methoxy-m-methylbenzoylphenylalanin werden mit 50 g Jodwasserstoffsäure vom spezifischen Gewicht 1,70 unter schwacher Rückflußkühlung und Kohlensäuredurchleitung

¹⁾ Mikroanalyse nach Pregl.

eine halbe Stunde auf dem Asbestteller gelinde gekocht. Die Säure löst sich rasch unter Abspaltung von Jodmethyl, das mit der Kohlensäure entweicht. Die Reaktionslösung wird nach dem Erkalten von der abgeschiedenen Benzoesäure durch Abgießen und Ausäthern befreit und unter stark vermindertem Druck abdestilliert. Der Destillationsrückstand wird in Wasser gelöst und zur möglichsten Entfernung der Jodwasserstoffsäure noch zweimal im Vakuum zur Trockene verdampft. Schließlich wird der Rückstand von jodwasserstoffsaurer Aminosäure in wenig heißem Wasser aufgenommen, mit Tierkohle gekocht, filtriert und heiß mit Ammoniak versetzt bis zur eben schwach alkalischen Reaktion. Nach etwaigem nochmaligen Filtrieren wird die Lösung der Krystallisation überlassen, wobei sich das m-Methyltyrosin in schönen, zu Büscheln angeordneten Prismen abscheidet. Nach nochmaligem Umkrystallisieren aus der etwa fünfzehnfachen Menge heißen Wassers ist die Aminosäure völlig rein und schmilzt bei 277° (unkorr. bei raschem Erhitzen).

Das m-Methyltyrosin ist in Wasser bedeutend leichter löslich als das Tyrosin, es krystallisiert ähnlich, nur viel derber als dieses. Es ist geschmacklos. Mit Millons Reagens gibt es in der Kälte eine Rotfärbung, die beim Erhitzen sehr intensiv wird.

I.	0,1737 g Substanz	gaben	0,3940 g CO_2	und	0,1065 g H_2O .
II.	0,1696 g		11,35 ccm N	bei 22°	und 746 mm.
	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_3$	berechnet:	C = 61,51%	H = 6,71%	N = 7,17%
		gefunden:	I. C = 61,86%	H = 6,79%	—
			II. —	—	N = 7,40%

Tierversuch.

Zur Untersuchung des Verhaltens des m-Methyltyrosins im normalen Organismus benützten wir ein Kaninchen von 3100 g, weil uns nur eine relativ geringe Menge der etwas schwer zugänglichen Aminosäure zur Verfügung stand.

Die Erzielung eines Gleichgewichts in der Ausscheidung von Kohlenstoff und Stickstoff gelingt am besten bei reiner Haferfütterung, bei der ein amphoter oder schwach sauer reagierender Harn ausgeschieden wird, während der Harn bei

Rübenfütterung stark alkalisch ist und reichlich Carbonate, Oxalate usw. absetzt, wodurch die Kohlenstoffbestimmungen unzuverlässig werden. Die Versuche bei Haferkost haben aber den Nachteil, daß die Tiere spontan sehr wenig Wasser aufnehmen und dementsprechend nur wenig und konzentrierten Harn ausscheiden. Wir haben versucht dieser Schwierigkeit dadurch zu begegnen, daß wir dem Tier täglich mittags 200 ccm Leitungswasser mit der Schlundsonde in den Magen gegossen haben. Den Nachteil dieses Verfahrens zeigt aber unser Versuch, indem uns das Tier am Tag nach dem Versuchstag bei der Eingießung einging, dadurch daß ein Teil des Wassers in die Lunge kam.

Das Tier entleerte seine Blase sehr gut, so daß durch Abpressen kein Harn mehr gewonnen werden konnte und deshalb auf diesen Eingriff, der die Tiere doch sehr häufig schädigt, verzichtet wurde. Der Harn wurde mit einer kleinen Käfigspülung gemessen und darin der Stickstoff nach Kjeldahl, der Kohlenstoff nach Messinger bestimmt wie in der II. Mitteilung. Die Resultate sind in Tabelle III enthalten.

Tabelle III.

Datum	Harnmenge	N %	N pro die	C %	C pro die	C : N	Bemerkungen
I. 3./4. III.	300	0,563	0,84	0,579	0,87	103,6	
4./5.			0,84		0,87		
II. 5./6.	215	0,343	0,74	0,357	0,77	104,1	
III. 6./7.	250	0,361	0,90	0,339	0,85	94,4	
IV. 7./8.	250	0,319	0,80	0,453	1,13	141,3	7. III., 5 ^h p. m. 2,1 g Methyltyrosin durch Schlundsonde
V. 8.	(25)	0,400	—	0,603	—	150,8	

Am 4. Tage der Tabelle, 7. März mittags wurden 2,1 g m-Methyltyrosin in Wasser gelöst in den Magen gegossen. Die Mehrausscheidung von Kohlenstoff an diesem Tage betrug darauf 0,33 g. Am 8. 1 Uhr mittags ging das Tier bei der Eingießung von Wasser ein. In der Blase fanden sich bei der Sektion 7 ccm Harn, die auf 25 ccm verdünnt und so zu den an-

gegebenen Analysen verwendet wurden. In diesem Harn fanden sich also noch 0,05 g auf Methyltyrosin zurückzuführender Kohlenstoff, so daß im ganzen am Versuchstag eine Mehrausscheidung von rund 0,4 g Kohlenstoff, entsprechend 0,64 g Methyltyrosin nachzuweisen war. Von der Aminosäure ist also der dritte Teil unvollständig verbrannt wieder im Harn nachzuweisen gewesen. Allenfalls wäre möglich, daß die Verbrennung eine noch unvollständigere gewesen ist, weil die weitere Verfolgung der C-Ausscheidung im Harn nicht möglich war. Nach den zahlreichen von uns und andern Autoren ausgeführten Fütterungsversuchen mit aromatischen Substanzen ist aber anzunehmen, daß auf den zweiten Tag nur noch ein geringer Bruchteil der Ausscheidungen entfällt. Wir müssen deshalb aus diesem Versuch schließen, daß das m-Methyltyrosin ebenso wie die Methylphenylalanine selbst bei relativ so hohen Dosen in sehr weitgehendem Maße, zu rund zwei Dritteln verbrannt wird.

Der Harn der Versuchsperiode vom 7./8. III. war nach Entfärbung mit Tierkohle optisch inaktiv. Er gab eine starke Millonsche Reaktion, die schon in der Kälte auftrat. Alkalische Kupferlösung wurde nicht mehr reduziert als beim normalen Harn. Der Ätherextrakt des mit Schwefelsäure angesäuerten Harns gab ebenfalls Millonsche Reaktion, ferner mit Eisenchlorid eine grüne, rasch in schmutzig braun übergehende Färbung. Er reduzierte ammoniakalische Silberlösung in der Kälte, gab also dieselben Reaktionen, die auch der p-Oxyphenylbrenztraubensäure zukommen. Der letzte bei der Sektion aus der Blase gewonnene Harn gab dieselben Reaktionen, die auf die Abbauprodukte des Methyltyrosins schließen lassen.

Nach den Farbreaktionen des Ätherextrakts ist anzunehmen, daß in demselben eine Ketonsäure, die p-Oxy-m-Methylphenylbrenztraubensäure, vorhanden war. Deren Isolierung hätte jedoch nur das Interesse einer weiteren Analogie des von Neubauer und seinen Mitarbeitern mehrfach nachgewiesenen Aminosäureabbaus gehabt. Wegen der zu erwartenden geringen Menge der Abbauprodukte und der schwierigen Zugänglichkeit des Ausgangsmaterials wurde deshalb eine Reindarstellung derselben nicht weiter versucht.

Versuche am Alkaptonuriker.

Der Versuch am normalen Tier ergab keinen Anhaltspunkt für eine bessere Verbrennbarkeit des m-Methyltyrosins als des m-Methylphenylalanins. Es kann demnach nicht der oben (S. 199) erwogene Schluß gezogen werden, daß durch die Einführung der p-OH-Gruppe ein physiologischer Abbaumodus für die ursprünglich dem Organismus fremde Substanz wieder zugänglich gemacht werden könnte. Die speziellere Frage aber war, ob durch den Eintritt der OH-Gruppe in p-Stellung der Übergang in ein p-Chinol und sekundär in ein Hydrochinonderivat begünstigt oder erst ermöglicht werden kann, und ob etwa nur durch die Unfähigkeit des Organismus, das m-Methylphenylalanin in p-Stellung zur Seitenkette, also in o-Stellung zum Methyl zu hydroxylieren, der Übergang in Homogentisinsäure verhindert ist. Darüber mußte ein Versuch am Alkaptonuriker Aufschluß geben: Im letzteren Fall müßte der Alkaptonuriker das m-Methyltyrosin in eine Methylhomogentisinsäure überführen können.

Der in der Tabelle IV zusammengestellte Versuch wurde in derselben Weise wie der oben beschriebene mit Methylphenylalanin (Tab. II.) ausgeführt. Der Versuch von Tabelle V wurde in der Freiburger medizinischen Klinik bei einer ähnlichen Kost an demselben Patienten angestellt. In beiden Versuchen wurde die Verbrennung der eingeführten Substanzen statt durch die Bestimmung der ätherlöslichen Säuren durch Kohlenstoffbestimmungen nach Messinger kontrolliert, wie in dem Tierversuch von Tabelle III. Die Werte der C-Ausscheidung sind in der neunten und zehnten Spalte der Tabellen angegeben.

Die Kohlenstoffwerte sind Mittel aus wenig differierenden Doppelbestimmungen. Die elfte Spalte der Tabelle enthält das Verhältnis Kohlenstoff zu Stickstoff ($N = 100$). Die übrigen Spalten sind analog Tabelle II.

Im ersten Versuch (Tab. IV) wurden am 3. Tag 8 g m-Methyltyrosin gegeben in 4 Dosen zu je 2 g auf den Tag verteilt. Am Versuchstag ist die N-Ausscheidung etwas niedriger, dabei das Verhältnis Hs:N so unbedeutend erhöht,

Tabelle IV.

Datum	Harn- menge	Spez. Gew.	N %	N pro die %	Hs. %	Hs. pro die	Hs.:N	C %	C pro die	C:N	Bemerkungen
I. 13./14. X.	1350	1024	1,11	14,6	0,50	6,8	46,7	0,890	14,4	100,5	
II. 14./15.	1820	1019	0,77	14,0	0,38	6,9	49,3		14,4		
III. 15./16.	2000	1014	0,53	12,5	0,33	6,6	52,4	0,613	12,3	98,4	8,0 g Methyltyrosin
IV. 16./17.	2300	1019	0,77	17,7	0,39	9,0	50,8	0,790	18,1	102,2	
V. 17./18.	1750	1019	0,87	15,3	0,44	7,7	50,4	0,854	14,9	97,7	
VI. 18./19.	2400	1016	0,68	16,1	0,45	10,9	67,7	0,731	17,5	109,0	8,0 g p-Oxyphenyl- brenztraubensäure
VII. 19./20.	1500	1024	1,17	17,6	0,59	8,9	50,3	1,203	18,0	102,6	

daß der Ausschlag noch innerhalb der normalen Grenzen der Schwankungen liegt. Es kann deshalb aus diesem Versuch kaum auf eine Alkaptonbildung aus der verfütterten Substanz geschlossen werden. Das Verhältnis C:N ist am Versuchstag sogar noch etwas niedriger als in der Vorperiode, so daß daraus zu schließen ist, daß unvollständig verbrannte Abbauprodukte nicht in nennenswerter Menge ausgeschieden worden sind. Am Nachtag zeigt sich eine vermehrte N-Ausscheidung, also etwas erhöhte Eiweißverbrennung, die wir nicht ohne weiteres erklären können, da in der Kost eine Änderung nicht eingetreten ist. Die Homogentisinsäure hält sich auf einer der Stickstoffausscheidung entsprechenden Höhe: das Verhältnis Hs:N ist wieder das normale. Der Kohlenstoff ist an diesem Tag ein wenig stärker vermehrt, als dem Stickstoff entspricht: Diese geringe Vermehrung ist das einzige, was auf das Vorhandensein einer mäßigen Menge von Abbauprodukten des Methyltyrosins im Harn schließen ließe. Diese Quantität kann jedoch nur eine verschwindend geringe sein, der Rest, also weitaus der größere Teil der Aminosäure muß vom Alkaptonuriker vollständig verbrannt worden sein.

Der zweite Versuch, der wegen der Wichtigkeit des Resultats zur Kontrolle diente (Tab. V.), ist ähnlich ausgeführt. Wir gaben dem Alkaptonuriker am dritten Tag der Periode 12 g Methyltyrosin in Dosen von je 2 g, in rascherer Folge als beim ersten Versuch, auf die Zeit von 12 Uhr mittags bis 8 Uhr abends verteilt. Die Tagesmengen des Harns

Tabelle V.

Datum	Harn- menge	Spez. Gew.	N %	N pro die %	Hs. %	Hs. pro die %	Hs.:N	C %	C pro die %	C:N	Bemerkungen
I. 9./10. II.	1400	1025	1,18	16,5	0,56	7,8	46,2	1,13	15,8	95,6	
II. 10./11.	1500	1023	1,12	16,8	0,56	8,3	49,6	1,06	15,9	94,5	
III. 11./12.	1900	1020	1,05	19,9	0,54	10,2	51,1	1,09	20,7	104,0	12,0 g Methyltyrosin in 6 × 2,0 g
IV. 12./13.	1500	1020	0,97	14,5	0,54	8,0	55,4	1,06	15,9	109,7	
V. 13./14.	1400	1022	1,11	15,6	0,52	7,2	47,8	1,09	15,3	98,0	

wurden um 8 Uhr morgens abgegrenzt. Hier zeigt sich am Versuchstag selbst eine vermehrte N-Ausscheidung, die über den mit der Aminosäure eingeführten N hinausgeht und wieder auf vermehrten Eiweißabbau zurückzuführen ist. Die Homogenisinsäure ist wenig stärker vermehrt, als der gesteigerten N-Ausscheidung entspricht, wie aus dem Verhältnis Hs : N hervorgeht. Der Kohlenstoff ist etwas stärker vermehrt. Am folgenden Tage besteht noch eine unbedeutende Vermehrung der Alkaptonausscheidung, ausweislich des Verhältnisses Hs : N, und ebenso eine mäßige Vermehrung des Kohlenstoffs im Harn über das dem Stickstoff entsprechende Maß hinaus. In diesem zweiten Versuch ist dementsprechend eine geringe Quantität unverbrannter Abbauprodukte des Methyltyrosins im Harn nachweisbar gewesen. Der Unterschied gegen den ersten Versuch erklärt sich durch die größere verabreichte Dose und die raschere Verabreichung derselben.

Aus den Zahlen der Tabelle V läßt sich berechnen, welche Mengen von solchen Abbauprodukten maximal im Harn vorhanden gewesen sein können. Im allgemeinen erfolgt nach Verfütterung einer Substanz deren Ausscheidung sehr rasch, gewöhnlich innerhalb der ersten 24 Stunden. Es ist deshalb überhaupt fraglich, ob man berechtigt ist, die Ausschläge des 4. Tages noch auf die Aminosäure zurückzuführen. Nimmt man deshalb den 3. und 4. Tag zusammen und erst den 5. wieder als normal an, dann berechnet sich daraus die größte Menge von unvollständig verbrannten Abbauprodukten, die allenfalls aus dem verabreichten Methyltyrosin entstanden sein kann.

Nimmt man in Tabelle V das Verhältnis Hs : N normal zu 49 an, dann berechnet sich für die beiden Tage zusammen eine Mehrausscheidung von Alkaptonsäuren von 1,8 g über die dem Stickstoff entsprechende Zahl. Es können also höchstens 1,8 g Methylhomogentisinsäure aus der verfütterten Aminosäure gebildet worden sein. Nimmt man analog das Verhältnis C : N = 97 als normal an, dann errechnet sich eine Mehrausscheidung von 3,5 g Kohlenstoff an den beiden Tagen, von denen 1,0 g den mehrausgeschiedenen Alkaptonsäuren entsprechen. 2,5 g mehrausgeschiedener Kohlenstoff konnte also in andern unverbrannten Abbauprodukten des Methyltyrosins enthalten sein, das entspricht 4,1 g dieser Aminosäure. Es sind demnach allenfalls noch 6 g der eingeführten Substanz unvollständig verbrannt im Harn vorhanden gewesen, wenigstens 6 g der Aminosäure demnach vom Alkaptonuriker verbrannt worden. In analoger Weise betrachtet ergibt der Versuch des 3. Tages von Tabelle IV, bei dem das m-Methyltyrosin mehr auf den Tag verteilt worden ist, eine fast quantitative Verbrennung desselben.

Auf die zu erwartenden Abbauprodukte wurde der Harn des Alkaptonurikers nicht weiter untersucht. Das Interesse an denselben konnte nur den Wert von Analogien haben und eine Isolierung ließ bei den geringen zu erwartenden Quantitäten und der großen chemischen Ähnlichkeit mit der im Harn vorhandenen Homogentisinsäure große Schwierigkeiten erwarten. Wir müssen aber als wahrscheinlich annehmen, daß nicht Methylhomogentisinsäure, sondern die ebenfalls reduzierende p-Oxy-methyl-phenylbrenztraubensäure im Harn vorhanden war.

Auf die Frage, ob etwa das Fehlen der Hydroxylgruppe in p-Stellung die Ursache dafür ist, daß aus dem m-Tolylalanin keine Alkaptonsäure gebildet wurde, geben diese Versuche eine eindeutige Antwort. Nimmt man die immerhin mögliche geringe Alkaptonbildung bei unsern beiden Versuchen (Tab. IV u. V) mit Methyltyrosin als richtig an, dann kommt man zu dem Resultat, daß bei dem methylierten Tyrosin durch die OH-Gruppe die Bildung einer Alkaptonsäure nur in ganz unerheblichem Grade begünstigt werden kann. Die Haupt-

menge der Aminosäure wird in beiden Fällen auf anderen Wegen zu den letzten Endprodukten abgebaut, ob die p-ständige OH-Gruppe vorhanden ist oder nicht. Es gibt also nicht nur für den ersten Eintritt der OH-Gruppe in den Benzolkern verschiedene Möglichkeiten, sondern auch bei in p-Stellung vorhandener OH-Gruppe noch andere Abbauege für den Organismus als den durch das Neubauersche Schema aufgestellten.

Auch für den Alkaptonuriker liegt das wichtige Resultat unserer Versuche nicht in den etwaigen unverbrannten Abbauprodukten, sondern in der zum ersten Male einwandfrei bewiesenen Tatsache, daß der Alkaptonuriker ganz erhebliche Mengen aromatischer, auch in p-Stellung zur Seitenkette hydroxylierter Aminosäuren glatt verbrennen kann, ohne daraus eine Alkaptonsäure zu bilden. Die Versuche von Dakin und uns mit den beiden Tolyalaninen haben zwar dieses Resultat schon nahegelegt, haben aber immer noch die Möglichkeit offen gelassen, daß durch abnorme Löslichkeitsverhältnisse die Hauptmenge der ausgeschiedenen Abbauprodukte dem Nachweis entgangen ist, oder daß in unserem Versuch (Tab. II) noch neutrale Abkömmlinge oder unveränderte Aminosäure vorhanden war. Wir fanden also die Befunde an den Tolyalaninen bestätigt: der Alkaptonuriker ist zu Abbaureaktionen befähigt, die nicht über die Alkaptonsäure führen. Denn daß der Alkaptonuriker einmal vorhandene Homogentisinsäure quantitativ wieder ausscheidet, wird für unsern speziellen Fall noch durch einen Versuch bewiesen, den der eine von uns demnächst in anderem Zusammenhang veröffentlichen wird.¹⁾

¹⁾ Versuch mit demselben Patienten:

Stickstoff pro die	17,3	—	18,5	—	16,5
Homogentisinsäure pro die	7,5	—	17,2	—	7,8
Hs. : N	47,4	—	92,6	—	47,2

Am zweiten Tag 8 g entwässerte Homogentisinsäure per os. Nach dem Verhältnis Hs : N berechnet sich für den zweiten Tag eine Mehrausscheidung von 8,4 g Homogentisinsäure.

Vgl. auch O. Gross, Biochem. Zeitschr., Bd. 61, S. 165 (1914).

III. Verhalten der p-Oxyphenylbrenztraubensäure beim Alkaptonuriker.

Die zahlreichen negativ verlaufenen Versuche, durch Verfütterung einer aromatischen Aminosäure eine Vermehrung der Alkaptonausscheidung zu verursachen, ließen uns das Bedürfnis entstehen, durch einen Versuch mit einer bekanntermaßen in Homogentisinsäure übergehenden Substanz die bisherigen negativen Resultate zu kontrollieren. Zunächst dieser Gesichtspunkt hat uns veranlaßt, die p-Oxyphenylbrenztraubensäure zu verfüttern von der O. Neubauer¹⁾ nachgewiesen hat, daß sie eine sehr reichliche Vermehrung der Alkaptonausscheidung verursacht.

Die p-Oxyphenylbrenztraubensäure wurde nach der von Neubauer und Fromherz²⁾ beschriebenen Methode unter Reinigung über die Bisulfitverbindung dargestellt und war dementsprechend völlig einheitlich. Wir haben in dem in der Tabelle IV (S. 206) wiedergegebenen Stoffwechselversuch am VI. Tag 8 g der Säure in derselben Weise verabreicht wie am dritten Tag das Methyltyrosin. Eine ausgesprochene Steigerung der Homogentisinsäureausscheidung und des Verhältnisses H : N an dem Versuchstag bestätigt den von Neubauer bereits gefundenen Übergang der Ketonensäure in das Hydrochinonderivat. Hinter einem quantitativen Übergang bleibt die Alkaptonbildung jedoch weit zurück.

Nimmt man bei dem Versuch das Verhältnis H : N mit 50,4 als normal an, dann berechnet sich für den VI. Tag eine Mehrausscheidung von 2,8 g Homogentisinsäure über die dem N entsprechende Menge hinaus, d. i. rund ein Drittel der bei einem quantitativen Übergang möglichen Menge. Vergleicht man damit die Resultate der fortgeführten Kohlenstoffbestimmungen, dann zeigt sich an dem Versuchstag eine Steigerung der C-Ausscheidung und des Verhältnisses C : N, die nicht über die durch die Homogentisinsäurevermehrung bedingte, hinausgeht. Das Verhältnis C : N mit 100 als normal angenommen, berechnet sich für den Versuchstag eine Mehrausscheidung von 1,4 g C entsprechend 2,5 g Homogentisinsäure. Daraus folgt: außer der Homogentisinsäure sind keine

¹⁾ O. Neubauer, D. Arch. f. klin. Med., Bd. 95, S. 211 (1909).

²⁾ O. Neubauer und K. Fromherz, Diese Zeitschrift, Bd. 70, S. 339 (1911).

weiteren Abbauprodukte der p-Oxyphenylbrenztraubensäure in nennenswerter Menge im Harn vorhanden gewesen, soweit dieselbe also nicht in Alkapton übergegangen ist, ist sie mindestens größtenteils, wenn nicht quantitativ, verbrannt worden.

Aus diesem Versuch ergibt sich die wichtige, in der Literatur noch nicht erwähnte Tatsache, daß der Alkaptonuriker auch Substanzen, die sicherlich als Abbaustufen der physiologisch vorkommenden aromatischen Aminosäuren aufgefaßt werden müssen, zu wesentlichen Anteilen zu verbrennen imstande ist. Auch für den Alkaptonuriker besteht die Möglichkeit, die aromatischen Aminosäuren des Eiweißes zu den letzten Endprodukten zu verbrennen.

Dieser Befund ist für unsere Auffassung von dem

Wesen der Stoffwechselstörung bei der Alkaptonurie.

von prinzipieller Bedeutung. Falta¹⁾ sowie Garrod und Hele²⁾ haben auf Grund des bei den verschiedenen Alkaptonurikern gleich befundenen Verhältnisses H:N = rund 50:100 die Auffassung vertreten, daß bei diesen, also so gut wie allen Fällen von Alkaptonurie die aromatischen Aminosäuren vollständig und ausschließlich in Homogentisinsäure übergeführt werden, statt der Verbrennung zu den letzten Endprodukten anheimzufallen, daß also die Fälle ein totales Unvermögen, die aromatischen Aminosäuren zu verbrennen, aufweisen, indem der ganze Abbau auf der Stufe der Homogentisinsäure stehen bleibt. Der eine von uns³⁾ hat seinerzeit diese Annahme einer «totalen Alkaptonurie» insbesondere auf Grund der Befunde von Groß und Allard⁴⁾ in Zweifel gezogen. In den vorliegenden Versuchen haben wir nun den Beweis für die Unrichtigkeit dieser Auffassung von der Stoffwechselstörung bei der Alkaptonurie. Der Alkaptonuriker ist imstande, einen großen Teil der physiologischen und diesen ähn-

¹⁾ Falta, D. Arch. f. klin. Med., Bd. 81, S. 231 (1904).

²⁾ Garrod und Hele, Journ. of physiology, Bd. 33, S. 198 und Bd. 35 (1907).

³⁾ Fromherz, Med. Diss., Freiburg 1908, S. 43.

⁴⁾ Gross u. Allard, Zeitschr. f. klin. Med., Bd. 64, S. 359 (1907).

lichen aromatischen Aminosäuren bis zu den letzten Endprodukten zu verbrennen. Von einer totalen Störung des Verbrennungsvermögens kann zwar sehr wohl bezüglich der Homogentisinsäure, nicht aber bezüglich der aromatischen Aminosäuren die Rede sein.

Der Normale kann, wie Abderhalden gezeigt hat,¹⁾ aus Tyrosin Homogentisinsäure bilden, er kann auch Homogentisinsäure in weitgehendem Maße verbrennen (Baumann und H. Embden²⁾). Ein Abbauweg für die aromatischen Aminosäuren kann also beim Normalen über die Homogentisinsäure gehen. Wie dem Alkaptonuriker stehen aber dem Normalen sicherlich auch andere Wege für die Verbrennung der aromatischen Aminosäuren offen, die nicht über ein Hydrochinonderivat als Zwischenprodukt führen. Der Normale verfügt also wenigstens über zwei, wahrscheinlich über mehrere Wege zum Abbau des Benzolkerns. Dem Alkaptonuriker ist allein der Weg über die Homogentisinsäure verschlossen, der ihm durch seine völlige Abbauunfähigkeit für diese Säure versperrt ist. Die anderen Wege sind ihm ebenso gangbar wie dem Normalen: Die Stoffwechselstörung bei der Alkaptonurie ist also eine weit weniger eingreifende, als man bisher anzunehmen geneigt war. Die Konstanz des Verhältnisses H:N bei den verschiedenen Fällen ist nicht durch die totale Unfähigkeit, aromatische Aminosäuren abzubauen, zu erklären. Sie erscheint vielmehr jetzt als der Ausdruck dafür, daß die verschiedenen Abbauwege in bestimmtem quantitativem Verhältnis zueinander begangen werden. Schwankungen des Verhältnisses H:N, wie sie Groß und Allard beobachtet haben, wären bei der dauernden totalen Abbauunfähigkeit für die Homogentisinsäure als Verschiebungen in dem Verhältnis der Abbauwege, stärkeres Vorherrschen des Weges über die Homogentisinsäure bei Steigerungen des Verhältnisses H:N und umgekehrt, zu deuten. Über diese Verhältnisse hat der eine von uns weitere Versuche im Gange, über die an anderer Stelle berichtet werden wird.

¹⁾ Abderhalden, Diese Zeitschrift, Bd. 77, S. 454 (1912).

²⁾ H. Embden, Diese Zeitschrift, Bd. 18, S. 327ff. (1994).

IV. Über das Verhalten von einfachen Chinolen im Organismus.

Unsere bisher beschriebenen Versuche bezogen sich zunächst auf die Frage, an welcher Stelle die erste Oxydation des Benzolkerns einer aromatischen Aminosäure einsetzt, dann auf die weitere Frage, ob die Fortsetzung der Oxydation zu einem Hydrochinonderivat führen muß, oder ob auch andere Wege des weiteren Abbaues möglich sind. Wir haben gesehen, daß wir die primäre p-Oxydation als einen vielleicht vorherrschenden Abbauweg ansehen müssen, aber ihn nicht als den einzigen anzunehmen berechtigt sind. Es hat sich ferner gezeigt, daß selbst nach gegebener p-Hydroxylierung der weitere Weg über das Hydrochinonderivat nicht einmal vorzuherrschen braucht, vielmehr noch andere Wege möglich sein müssen, die selbst dem Alkaptonuriker offen stehen.

Daß auch dem Normalen der Abbauweg über das Hydrochinonderivat möglich sein muß, hat Abderhalden¹⁾ bewiesen, indem er zeigte, daß bei übermäßiger Tyrosinfütterung Homogentisinsäure im Harn auftreten kann. Diese Überführung von Tyrosin in Homogentisinsäure ist am leichtesten auf dem Weg über ein Chinol zu erklären und chemisch vorläufig nicht anders verständlich. Beweise für das Vorkommen solcher Zwischenprodukte im Organismus stehen aber noch aus.

Eine wesentliche Stütze für die Annahme von Chinolen als Zwischenprodukte wäre aber immerhin der Nachweis, daß der Organismus imstande ist, solche Substanzen zu verarbeiten. Ließe sich zeigen, daß ein Chinol im Tierkörper leicht in ein Hydrochinon umgelagert oder verbrannt wird, dann hätte die in dem Neubauerschen Abbauschema enthaltene Theorie ganz wesentlich an Wahrscheinlichkeit gewonnen.

Aus dieser naheliegenden Überlegung heraus hat schon Friedmann²⁾ beabsichtigt, eine Chinolessigsäure zu verfüttern. Gegen die Wahl der Chinolessigsäure zur Bearbeitung dieser Frage lassen sich auch schon prinzipielle Bedenken anführen:

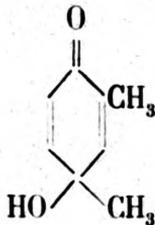
¹⁾ a. a. O.

²⁾ Friedmann, Hofmeisters Beitr., Bd. 11, S. 304.

Für die Angreifbarkeit des Benzolkerns im Organismus ist bekanntlich eine dreigliedrige Seitenkette wesentlich. Negative Resultate mit der Essigsäure wären also nicht überraschend und würden nichts beweisen. Aus diesem Grund beabsichtigten auch Neubauer und Tannhauser¹⁾ eine Chinolsäure darzustellen und zu verfüttern, die selbst als Zwischenprodukt anzunehmen war, die Chinolbrenztraubensäure. Auch diese Versuche sind an den chemischen Schwierigkeiten der Darstellung der gesuchten Substanz gescheitert.

Wegen dieser Schwierigkeiten verzichteten wir darauf, ein dem Organismus seiner Konstitution nach angepaßtes Chinol darzustellen, und begnügten uns damit einfachere Chinole in ihrem Verhalten im Organismus zu untersuchen, ohne uns dabei zu verhehlen, daß ein negatives Resultat uns in der Frage nicht weiter bringt und sich nur ein ausgesprochen positives Resultat für die Hypothese verwerten läßt.

a) m-Dimethylchinol.



Nach der Vorschrift von Bamberger²⁾ läßt sich m-Dimethylchinol mit ziemlich guter Ausbeute aus as-Nitro-m-Xylol über das entsprechende Hydroxylamin darstellen. Wir verwendeten zu unsern Versuchen ein aus Wasser umkrystallisiertes Präparat vom richtigen Schmelzpunkt 64°. Es ist eine schön krystallisierende, recht beständige Substanz.

Für Kaninchen ist m-Dimethylchinol bei jeder Art der Applikation ziemlich giftig; es verursacht cerebrale Erregungszustände und allgemeine Krämpfe. Methhämoglobin wird nicht gebildet.

Einem Hund von 15 kg wurden innerhalb von 6 Stunden zweimal je eine Dose von 2,0 g m-Dimethylchinol in Wasser

¹⁾ Tannhauser, Med. Dissertation, München 1910.

²⁾ Reber, Phil. Diss., Zürich 1903.

gelöst subcutan injiziert, da bei der Verfütterung Erbrechen eingetreten war. Der Hund ertrug diese Injektionen, ohne Vergiftungserscheinungen zu zeigen. — Der Harn der nächsten 24 Stunden gab wohl Chinolreaktionen, aber keine Hydrochinonreaktionen: Weder ammoniakalische Silberlösung noch Kupferlösung wurde reduziert, Eisenchlorid gab keine Grünfärbung, sondern nur eine schmutzibraune Farbe. Mit essigsaurem Phenylhydrazin wurde eine Fällung erzielt, die aus dem Chinol entstandene Azoverbindungen bedeutet. Eine Rückgewinnung des Chinols in krystallisiertem Zustand oder eines Umwandlungsproduktes gelang nicht. Die Ätherextrakte des Harns waren so stark verharzt, daß eine Reinigung bisher nicht möglich war.

Nachdem der Hund 4 g des Chinols innerhalb von 6 Stunden symptomlos ertragen hatte und der eine von uns selbst 2 g innerlich genommen hatte, ohne irgendwelche Beschwerden darauf zu verspüren, glaubten wir uns berechtigt, dem Alkaptonuriker auch eine etwas größere Menge des Präparats zu geben. Der Alkaptonuriker ist ja der Organismus, dessen Fähigkeit, ein Hydrochinonderivat zu bilden, in besonders eklatanter Weise in Erscheinung tritt, bei dem also eine Hydrochinonbildung auch am ehesten zu erwarten und durch die quantitative Bestimmung der Reduktionsfähigkeit des Harns für ammoniakalische Silberlösung zu verfolgen ist.

Diese Versuchsperiode ist in Tabelle II enthalten (s. o.), an deren VI. Tage dreimal je 2,0 g Dimethylchinol morgens, mittags und abends, zusammen also 6,0 g, per os gegeben wurden. Wie die Tabelle zeigt, vermochte aber auch der Alkaptonuriker kein Hydrochinon aus dem Chinol zu bilden, der Quotient H:N sinkt sogar am Versuchstag etwas ab. Die Untersuchung des Harns ergab eine geringe Vermehrung der Ätherschwefelsäuren am Chinoltag. Die Reduktion für ammoniakalische Silberlösung wurde aber auch durch Kochen mit Salzsäure nicht stärker. Qualitativ ließ sich aus dem Harn ebensowenig ein Umwandlungsprodukt des Chinols fassen wie aus dem Harn des Hundes: Stark verharzte Produkte verhinderten eine Reinigung. Es wurde nur mit Mühe

eine geringe Menge einer krystallinischen Substanz gewonnen, die sich aber durch Schmelzpunkt und Reaktionen als Homogentisinsäurelacton erwies.

Vor Wiederholungen solcher Versuche mit Chinolen am Menschen müssen wir jedoch warnen. Wenn auch dieses m-Dimethylchinol relativ ungiftig ist, so kann es zum mindesten, wenn es nicht frisch umkrystallisiert ist, giftige Zersetzungsprodukte enthalten:

Bei einem späteren Versuch mit einem älteren Präparat ging ein Hund von 11 kg auf eine einmalige Dose von 2,0 g subcutan innerhalb von 2 Tagen an Vergiftungserscheinungen von seiten des Zentralnervensystems ein. Bei diesem Versuch beabsichtigten wir durch die Kohlenstoffbestimmung nach Messinger die Verbrennbarkeit oder Ausscheidung des Chinols im Harn zu verfolgen. Die Resultate sind in Tabelle VI enthalten. In der Vorperiode war wohl ein konstantes

Tabelle VI.

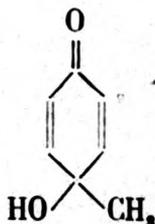
Datum	Harnmenge	Spez. Gew.	N %	N pro die	C %	C pro die	C : N	
I. 12./13. XI.	800	1009	0,54	4,9	0,39	3,5	0,748	
II. 13./14.	600	1014	0,80	5,6	0,64	4,5	0,801	
III. 14./15.	(100)	1017	0,51	—	1,48	—	2,88	2 g Dimethylchinol.

Maß der Ausscheidungen erzielt. Am Versuchstag selbst traten aber Vergiftungserscheinungen auf mit profusem Speichelfluß und Erbrechen. Es konnte infolgedessen nur eine geringe Menge Harn ohne Verunreinigung durch andere Exkrete durch Kathetrismus gewonnen werden. Wie die Zahlen der Tabelle ergeben enthielt dieser Harn aber reichlich 1 g Kohlenstoff über die dem Stickstoff entsprechende Menge hinaus: es ist also in dem gewonnenen Harn gut $\frac{2}{3}$ des eingeführten Chinols enthalten gewesen, unverändert oder umgewandelt, nicht aber als Hydrochinon, wie die Reaktionen des Harns zeigten.

Durch diese Versuche ist das untersucht, was im Rahmen dieser Arbeit von Interesse war. Das verfütterte Chinol wird nicht in wesentlichen Anteilen verbrannt und es wird weder vom Alkaptonuriker noch vom nor-

malen Hund in Hydrochinon übergeführt. Was weiter mit dem Chinol geschieht, ist für unsere Fragestellung ohne Bedeutung und soll, wenn es noch gelingt, aus dem Harn ein Umwandlungsprodukt des Chinols zu fassen, später mitgeteilt werden.

b) Toluchinol.



Das einfachste bekannte Chinol, das Toluchinol, wurde nach der Vorschrift von Bamberger¹⁾ aus p-Tolyhydroxylamin dargestellt. Das zu den Versuchen verwendete Präparat war durch mehrmaliges Umkrystallisieren aus Schwefelkohlenstoff und aus Wasser gereinigt und in schönen Prismen krystallisiert. Herr Professor Bamberger hatte die Güte, uns zum Vergleich und als Impfmaterial ein von ihm dargestelltes Präparat zur Verfügung zu stellen, wofür wir ihm auch an dieser Stelle unsern verbindlichsten Dank aussprechen.

Wegen der großen Giftigkeit dieses Chinols waren aber Stoffwechselversuche mit demselben nicht durchführbar. Kaninchen gingen auf 0,1 g pro Kilogramm innerhalb von weniger als einer halben Stunde an cerebralen Erregungszuständen, denen Krämpfe folgten, ein. Bei einem Hund von 10 Kilogramm verursachten 0,5 g in Wasser gelöst subcutan injiziert Erbrechen und Durchfall. Nach einer halben Stunde wurden nochmals 0,5 g injiziert, worauf heftige Krämpfe klonischer und tetanischer Art auftraten, die nach 1 Stunde in einen Lähmungszustand übergingen, in dem das Tier 3 Stunden nach der ersten Injektion verendete.

In dem während der Vergiftung durch Katheter entnommenen Harn war weder Chinol noch Hydrochinon nach-

¹⁾ Bamberger, Liebigs Annalen, Bd. 390, S. 164.

weisbar. Bei der Sektion war die Blase leer. Methämoglobin war nicht nachweisbar.

Nach diesem Versuch wurden weitere Versuche mit dieser Substanz als aussichtslos aufgegeben.

Die beschriebenen Stoffwechselversuche mit den beiden einfachen Chinolen haben das von vornherein zu befürchtende negative Ergebnis gehabt: Weder der Normale noch der Alkaptonuriker war imstande, die Chinole zu verbrennen oder umzulagern. Daraus kann aber nicht geschlossen werden, daß sich nicht das wirklich als Zwischenprodukt anzunehmende Chinol der Phenylbrenztraubensäure ganz anders verhält. Das positive Resultat hätte die Hypothese des Abbaus über Chinole gestützt, das negative Resultat ist nicht imstande, sie unwahrscheinlicher zu machen.

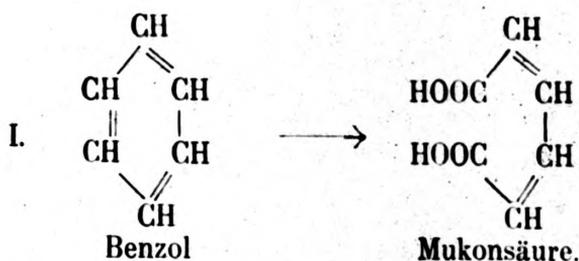
V. Das Verhalten des 3,4-Dioxyphenylalanins im Organismus.

Aus den zuerst beschriebenen Untersuchungen hat sich ergeben, daß neben dem im Organismus möglichen Abbauweg über das Hydrochinonderivat auch noch andere Verbrennungsmöglichkeiten für den Benzolkern existieren müssen, die nicht über eine p-Dioxyverbindung führen. Diese stehen selbst dem Alkaptonuriker zu Gebote, der die Hydrochinonderivate nicht weiter zu verbrennen imstande ist. Sie können nicht nur dann beschritten werden, wenn in den Benzolkern noch keinerlei Oxydation eingetreten ist, sondern auch dann, wenn der Anfang einer solchen schon gemacht ist in der Form einer Hydroxylierung in p-Stellung.

Wie sollen wir uns nun die endgültige Auflösung des Benzolrings im Organismus vorstellen? Einen wichtigen Anhaltspunkt bietet uns hierfür die von Jaffé¹⁾ gefundene Umwandlung des Benzols in Mukonsäure, die eine Aufspaltung des Rings durch Oxydation zweier benachbarter Kohlenstoffatome zu Carboxylgruppen bedeutet. In ähnlicher Weise fand Fühner²⁾ eine

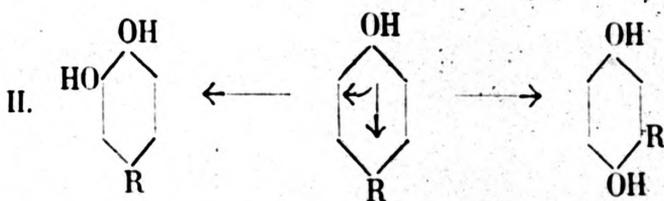
¹⁾ Jaffé, Diese Zeitschrift, Bd. 62, S. 58 (1909).

²⁾ H. Fühner, Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie, Bd. 55, S. 27 (1906).



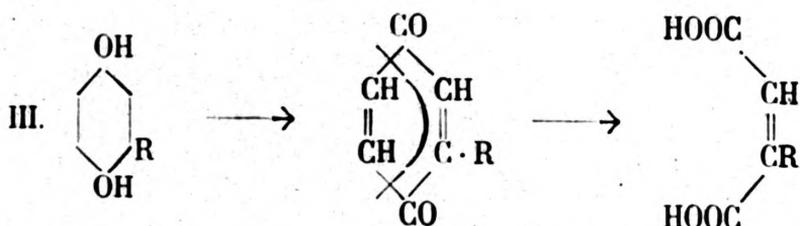
Oxydation zweier benachbarter Kohlenstoffatome eines Benzolkerns bei der Verfütterung von Chinolin, das in 5, 6-Chinolinchinon, ein o-Chinon überging. An diese Befunde schließen sich die folgenden Überlegungen an:

Aus dem Beispiel des Tyrosins und der p-Oxyphenylbrenztraubensäure, insbesondere ihrem Verhalten beim Alkaptonuriker wissen wir, daß bei diesen die weitere Oxydation in p-Stellung zur OH-Gruppe erfolgt unter Verdrängung der Seitenkette an das benachbarte C-Atom. Es ist bekannt, daß diesem Vorgang rein chemisch genügend Analogien zur Seite stehen und daß derselbe der Natur der OH-Gruppe als Substituenten erster Ordnung entspricht, der den weiteren Substituenten in die p-Stellung dirigiert. Wir wissen aber weiter, daß solche Substituenten erster Ordnung auch in die o-Stellung dirigieren, wodurch in unserem Fall eine o-Dioxyverbindung, also ein Brenzkatechinderivat entstehen müßte.

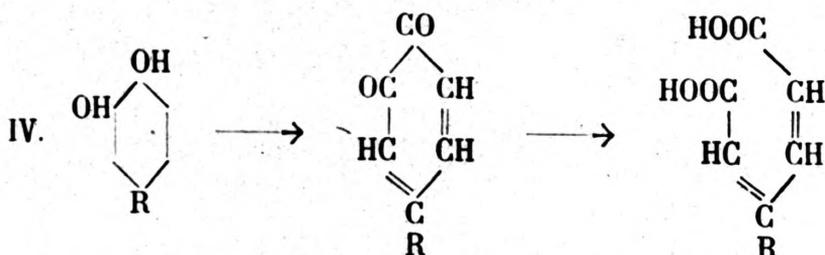


Diese o-Dioxyverbindungen haben den Hydrochinonderivaten ähnliche Eigenschaften. Letztere gehen durch Oxydation in die p-Chinone über, die leicht durch weitere Oxydation unter Heraussprengung zweier C-Atome, wie die Formeln (III) veranschaulichen, in aliphatische Dicarbonsäuren übergehen. Das chemische Analogon hierfür bilden die interessanten Versuche von Kempf,¹⁾ der mit Silberperoxyd eine Aufspaltung des Benzolkerns unter Bildung von Maleinsäure erzielte.

¹⁾ Kempf, Ber. d. D. Chem. Ges., Bd. 38, S. 3963.



Ganz analog gehen (vgl. Formeln IV) die o-Dioxyverbindungen in o-Chinone über, die unschwer der Aufspaltung zu substituierten Mukonsäuren unterliegen würden.



Aus dieser Überlegung ergibt sich die Möglichkeit der intermediären Bildung von o-Dioxyverbindungen, also von Brenzkatechinderivaten beim Abbau aromatischer Substanzen, speziell aromatischer Aminosäuren im Organismus. Für eine solche Annahme kann z. B. die Bildung des Adrenalins im Tierkörper herangezogen werden, sowie die Tatsache, daß nach Verfütterung von Benzolderivaten nur o- und p-Dioxyderivate entstehen, nie Resorcinderivate.¹⁾ Um diese Hypothese weiter zu begründen, haben wir das 3,4-Dioxyphenylalanin dargestellt und sein Verhalten im Stoffwechsel untersucht.

Das 3,4-Dioxyphenylalanin ist bereits von C. Funk²⁾ aus dem CO₂-Ester des 3,4-Dioxybenzaldehyds durch Kondensation mit Hippursäure dargestellt worden, eine Methode, die den Nachteil eines schwer zugänglichen Ausgangsmaterials besitzt. Funk hat auch festgestellt,³⁾ daß diese Aminosäure für Tyrosinasen und Lakkasen einen günstigen Angriffspunkt bietet, was ebenfalls für die Wahrscheinlichkeit der Rolle der o-Dioxyverbindungen beim Abbau des Benzolkerns verwertet werden kann. In neuester Zeit hat Guggenheim⁴⁾ dieselbe Amino-

¹⁾ Knoop, Habilitationsschrift, Freiburg 1904, S. 12.

²⁾ Casimir Funk, Chem. soc. of London, Bd. 99, S. 554 (1911).

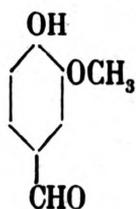
³⁾ C. Funk, Chem. soc. of London, Bd. 101, S. 1007 (1912).

⁴⁾ Guggenheim, Diese Zeitschrift, Bd. 88, S. 276 (1913).

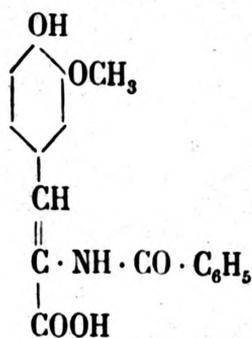
säure in optisch aktiver Form aus pflanzlichem Rohmaterial isoliert, ein Befund, der wieder auf eine größere Bedeutung der o-Dioxyverbindungen im physiologischen Chemismus hindeutet. Die Arbeit von Guggenheim erschien jedoch leider erst, als wir die Aminosäure schon auf unserem Weg dargestellt hatten, konnte uns also die Versuche nicht mehr erleichtern.

Des leicht erhältlichen Ausgangsmaterials wegen ist die von uns geübte Darstellungsmethode des 3,4-Dioxyphenylalanins, die zu demselben, nur optisch inaktiven Körper führt, den auch Guggenheim erhalten hat, wohl nicht ohne Wert, obwohl die Ausbeuten zu wünschen übrig lassen. Sie sei deshalb hier beschrieben:

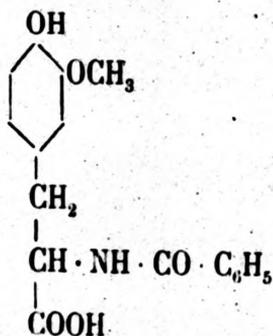
Die Darstellung des 3,4-Dioxyphenylalanins erfolgte in engem Anschluß an die oben beschriebene Darstellung des m-Methyltyrosins, mit Vanillin als Ausgangsmaterial. Vanillin (I.) wurde durch Kondensation mit Hippursäure und Aufspaltung des zunächst entstehenden Azlactons in die p-Oxy-m-Methoxy-benzoylaminozimmtsäure (II.), die mit Natriumamalgam zu p-Oxy-m-Methoxy-benzoylphenylalanin (III.) reduziert wurde. Durch Abspaltung des Benzoyls und der Methylgruppe durch Jodwasserstoff wird aus der letzteren Verbindung das 3,4-Dioxyphenylalanin (IV.) erhalten.



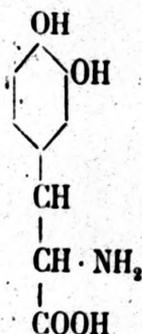
I.



II.



III.



IV.

1. p-Oxy-m-Methoxy-benzoylaminozimmtsäure: 25 g Vanillin, 17 g wasserfreies Natriumacetat und 35 g Hippursäure werden fein pulverisiert und sorgfältig gemischt, das Ganze im Kölbchen mit 65 g Essigsäureanhydrid übergossen, gemischt und im siedenden Wasserbad 20–30 Minuten erhitzt. Die Masse färbt sich gelb, wird zunächst flüssig und

erstarrt dann zu einem Krystallkuchen, der nach dem Erkalten mit wenig Wasser angerieben und auf der Nutsche abgesaugt wird. Die Krystallmasse wird mit kaltem, heißem Wasser und schließlich mit 20%igem Alkohol gewaschen und sofort zur Aufspaltung zur Benzoylaminozimmtsäure mit verdünnter Natronlauge auf dem Wasserbad bis zur völligen Lösung erhitzt. Nach dem Abfiltrieren geringer Verunreinigungen fällt man durch Ansäuern die rohe p-Oxy-m-Methoxy-benzoylaminozimmtsäure aus, die nach Stehen über Nacht auf der Nutsche gesammelt und gewaschen wird. Durch Umkrystallisieren aus Aceton und Wasser erhält man sie in schön ausgebildeten Prismen vom Schmelzpunkt 211°. Ausbeute 70% der Theorie.

0,1670 g Substanz: 7,0 ccm N bei 20° und 739 mm

$C_{17}H_{15}NO_5$ berechnet: N = 4,47%

gefunden: N = 4,65%

2. p-Oxy-m-Methoxy-benzoylphenylalanin: Bei der Behandlung dieser Vanillinderivate mit überschüssigen Alkalien macht sich die freie OH-Gruppe dadurch geltend, daß infolge stärkerer Harzbildung die Ausbeuten schlechter werden. Wir haben deshalb mit Vorteil bei der bisherigen Vorschrift das Kochen mit Natronlauge weggelassen und nur mit der berechneten Menge Natriumamalgam reduziert: 20 g p-Oxy-m-Methoxy-benzoylaminozimmtsäure werden pulverisiert und in Wasser suspendiert mit der berechneten Menge titriertem etwa 3%igem Natriumamalgam reduziert. Bei allmählichem Zusatz des Amalgams innerhalb einer halben Stunde löst sich die Säure rasch unter Bildung einer stark gelben Lösung, die bei Beendigung der Reaktion wieder annähernd farblos wird. Nach Abtrennung vom Quecksilber und Filtrieren wird sofort angesäuert, wobei die reduzierte Säure als weiche, fast ölige Masse ausfällt und sich beim Stehen über Nacht am Boden des Gefäßes festsetzt. Es wird dann durch Abgießen und Nachspülen von der sauren Lösung abgetrennt und die zähe Masse im gleichen Kolben unter Erwärmen in 30 ccm Eisessig gelöst; die Eisessiglösung, ohne Filtrieren in einem kleinen Kölbchen gesammelt, erstarrt beim Erkalten zu einer Krystallmasse, die am folgenden Tage auf der Nutsche abgepreßt und

mit kaltem Eisessig, verdünnter Essigsäure und Wasser gewaschen wird. Das so erhaltene p-Oxy-m-Methoxy-benzoylphenylalanin ist bereits so gut wie rein und zeigt gewöhnlich schon den richtigen Schmelzpunkt 164°. Zur weiteren Reinigung kann man aus heißem Alkohol und Wasser umkrystallisieren, woraus die Substanz in Büscheln von mikroskopisch prismatischen Blättchen sich abscheidet. Ausbeute an aus Eisessig krystallisierter Substanz ca. 50% der Theorie.

I. 0,1725 g Substanz: 0,4090 g CO₂ und 0,0950 g H₂O.

II. 0,2352 „ „ 9,8 ccm N bei 25,5° und 740 mm.

C₁₇H₁₇NO₅: berechnet: C = 64,73%, H = 5,45%, N = 4,45%

gefunden I.: C = 64,63%, H = 6,11%, —

II.: — — N = 4,49%

3. 3,4-Dioxyphenylalanin. 20 g p-Oxy-m-Methoxybenzoylphenylalanin werden mit 50 ccm Jodwasserstoffsäure vom spez. Gew. 1,70 übergossen und unter schwacher Rückflußkühlung und Verjagen des gebildeten Jodmethyls im lebhaften Kohlensäurestrom 1 St. auf dem Asbestteller erhitzt. Nach dem Erkalten wird die abgeschiedene Benzoesäure durch Abgießen, Filtrieren und Ausäthern des Filtrats entfernt und das vereinigte Filtrat im Vakuum vollständig eingedampft, das Verdampfen zur möglichsten Entfernung des Jodwasserstoffs nach Aufnehmen des Rückstands in Wasser zweimal wiederholt. Wegen der leichten Oxydierbarkeit der freien Aminosäure in neutraler oder gar schwach alkalischer Lösung bewährte sich uns dann das folgende Verfahren, dieselbe aus ihrem HJ-Salz in Freiheit zu setzen: Der Verdampfungsrückstand wird in 200 ccm Wasser gelöst und mit einem Überschuß von Natriumacetat und Natriumbisulfitlauge versetzt, das Gemisch wieder im Vakuum zur Trockene verdampft. Aus dem Rückstand werden die Salze durch Schütteln mit kaltem Wasser herausgelöst, wobei die freie Aminosäure größtenteils ungelöst zurückbleibt. Nach Absaugen auf der Nutsche und Nachwaschen mit kaltem Wasser wird dieselbe unter Zusatz von wenig Bisulfit aus heißem Wasser umkrystallisiert. Das inaktive 3,4-Dioxyphenylalanin krystallisiert daraus in wetzsteinförmigen Krystallen, die vielfach zu Rosetten und

Büscheln verwachsen sind. Es schmilzt bei 285° bei raschem Erhitzen. Mit Eisenchlorid gibt es eine intensive Grünfärbung, die kurze Zeit bestehen bleibt, mit Natronlauge eine Rotfärbung, mit Millons Reagens eine orangerote Färbung.

- I. 4,006 mg Substanz: 8,06 mg CO_2 und 1,98 mg H_2O
 II. 4,199 " " " 263 ccm N bei 16° und 732 mm

(Mikroanalysen nach Pregl).

$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_4$: berechnet: C = 54,79%, H = 5,63%, N = 7,12%,
 gefunden I.: C = 54,87%, H = 5,53%, —
 II.: — — N = 7,13%,

Tierversuche.

Bei den ersten Versuchen, das Dioxyphenylalanin wie die früheren Substanzen an Hunde zu verfüttern und die Ausscheidung unvollständig verbrannter Abbauprodukte im Harn durch die Bestimmung des Kohlenstoffs zu verfolgen, machten pharmakologische Wirkungen der Aminosäure sich störend bemerkbar. Wir waren zunächst geneigt, diese Wirkungen auf Verunreinigungen zurückzuführen, da Guggenheim in den von ihm beschriebenen Versuchen keine solche beobachtet hat. Nur in einem Selbstversuche Guggenheims verursachte auch die aktive Aminosäure Übelkeit und Erbrechen, dieselbe Qualität der Wirkung, die auch die Recemform aufweist. Das r-3,4-Dioxyphenylalanin verursacht bei Hunden sowohl per os als subcutan appliziert heftigen Brechreiz, der jeden Stoffwechselfersuch unmöglich macht. Gleichzeitig fällt an den Tieren eine Erregung der Haarmuskeln des ganzen Körpers auf. Bei Kaninchen, die keinen Brechmechanismus besitzen, tritt ähnlich den Erscheinungen der Apomorphinvergiftung ein Erregungszustand auf, der sich in unruhigem Umherlaufen und in einem Nagetrieb äußert. Die Wirkung auf das Fell ist dieselbe. Auf den Blutdruck wirkt die Substanz in größeren Dosen bei intravenöser Injektion erniedrigend.

Ein Stoffwechselfersuch war der Brechwirkung wegen nur am Kaninchen ausführbar und wurde bei Haferkost in derselben Weise ausgeführt wie der auf S. 202 ff. beschriebene mit m-Methyltyrosin. Um einen direkten Vergleich zu besitzen mit der Verbrennbarkeit einer Substanz, die sicher im

Organismus verbrannt wird und als Zwischenprodukt des Tyrosinabbaus anzunehmen ist, haben wir in demselben Versuch p-Oxyphenylbrenztraubensäure verfüttert und zwar in derselben Weise und derselben Dose wie nachher die Dioxiaminosäure. Tabelle VII gibt die Übersicht über diesen Versuch.

Tabelle VII.

Datum	Harn- menge	Spez. Gew.	N %	N pro die	C %	C pro die	C:N	C- Ver- meh- rung	Bemerkungen
I. 16./17. III.	160	1024	1,17	1,87	1,28	2,05	1,10	—	
II. 17./18.	120	1012	0,45	0,54	0,44	0,53	0,98	—	
III. 18./19.	355	1006	0,27	0,96	0,25	0,87	0,91	—	
IV. 19./20. III.	360	1005	0,17	0,62	0,30	1,08	1,74	0,46	2,0 g p-Oxyphenyl- brenztraubens. per os.
V. 20./21. III.	210	1007	0,40	0,85	0,49	1,02	1,20	0,17	Millon noch positiv.
VI. 21./22.	280	1007	0,33	0,92	0,33	0,94	1,02	—	Millon: Spur.
VII. 22./23.	270	1006	0,31	0,84	0,31	0,83	0,99	—	» negativ.
VIII. 23./24. III.	250	1013	0,18	0,44	0,36	0,89	2,02	0,46	2,0 g Dioxiphenyl- alanin per os.
IX. 24./25. III.	300	1007	0,45	1,35	0,51	1,52	1,13	0,17	Ag-Reduktion noch deutlich.
X. 25./26.	170	1004	0,31	0,52	0,30	0,51	0,98	—	Ag-Reduktion: geringe Spur.

Die Tagesmengen des Harns wurden durch Abpressen abgegrenzt, was in den ersten beiden Tagen vielleicht nicht vollständig gelungen war. Da sich die Schlüsse jedoch auf das Verhältnis C:N stützen, ist diese Abgrenzung nicht von ausschlaggebender Bedeutung. Die Analysen wurden wie in den früheren Versuchen ausgeführt.

Das Kaninchen wog im Anfang des Versuchs 2600 g und fraß anfangs gut, zeigte jedoch im Laufe des Versuchs Abnahme der Freßlust und des Körpergewichts und wog am Ende des Versuchs noch 2000 g. Der Versuch ist also annähernd ein Hungerversuch.

Die Substanzen wurden nach der Abgrenzung des Harns des vorangehenden Tages in einer Portion in Wasser gelöst durch die Schlundsohle eingegossen. Während die p-Oxyphenyl-

brenztraubensäure ohne Wirkung war, verursachte dabei die 3,4-Dioxyaminosäure den oben beschriebenen Erregungszustand, der erst am folgenden Tage einer Ermattung Platz machte.

Die Vermehrung des Kohlenstoffes im Harn, berechnet aus dem Verhältnis C:N, das mit 1 als normal angenommen wurde, ist in der vorletzten Spalte der Tabelle angegeben. Sie ist bei dem 3,4-Dioxyphenylalanin dieselbe wie bei der p-Oxyphenylbrenztraubensäure. Da der Kohlenstoffgehalt der letzteren nur unbedeutend höher ist, ist demnach die Verbrennung des 3,4-Dioxyphenylalanins annähernd eine ebenso weitgehende gewesen wie die der p-Oxyphenylbrenztraubensäure, d. h. es wird unter den Bedingungen des Versuches die Hälfte beider eingeführten Substanzen verbrannt, etwa 1 g unverbrannt ausgeschieden.

Der Verlauf der Ausscheidung wurde neben der Kohlenstoffbestimmung auch durch die Reaktionen des Harnes verfolgt, bei der ersten Substanz durch die Millonsche Reaktion, bei der Dioxyaminosäure durch die Eisenchloridreaktion und die Reduktion ammoniakalischer Silberlösung, wie in der letzten Spalte der Tabelle VII angegeben. Bei beiden Substanzen zeigten sich am ersten Nachtag entsprechend der Kohlenstoffvermehrung noch deutlich die Reaktionen der verfütterten Substanz, am zweiten Nachtag jedoch nur noch spurweise. Die Kurve der Ausscheidung verläuft also bei beiden Substanzen in derselben Weise.

Im Harn sind nach Verfütterung des Dioxyphenylalanins ätherlösliche Abbauprodukte vorhanden, deren Untersuchung wir Herrn Guggenheim überlassen, der solche Versuche bereits in Aussicht gestellt hat.

Durch diesen Versuch mit 3,4-Dioxyphenylalanin ist bewiesen, daß im Organismus 3,4-Dioxyverbindungen im gleichen Maße verbrannt werden können, wie die natürlich vorkommenden 4-Oxyverbindungen. Da bekannt ist, daß im Organismus 3,4-Dioxyverbindungen, also Brenzkatechinderivate entstehen und nun dieselben auch mit derselben Leichtigkeit wie die natürlichen p-Oxyverbindungen zerstört werden können, müssen wir dieses Resultat als wesentliche Stütze für unsere oben

entwickelte Annahme ansehen, daß es für den Organismus neben dem Abbau des Benzolkerns über ein Hydrochinonderivat auch einen solchen über das o-Dioxy- oder Brenzkatechinderivat gibt.

Zusammenfassung.

In der ersten und zweiten Mitteilung haben wir gezeigt, daß der Abbau eines methylierten Phenylalanins in gleicher Weise erfolgt, ob die Methylgruppe in p- oder in m-Stellung zur Seitenkette steht, ob die Hydroxylierung in p-Stellung möglich ist oder nicht. Es war daraus der Schluß zu ziehen, daß neben dem Abbau durch die primäre p-Oxydation auch ein solcher durch primäre Oxydation an anderer Stelle möglich ist.

Wir haben dann in der vorliegenden Mitteilung zunächst (I. Teil) das Verhalten der beiden Tolyllalanine beim Alkaptonuriker verglichen, wobei sich ein völliger Abbau beider Isomere ergab ohne Bildung eines Hydrochinonderivats. Bei dem m-Methylphenylalanin konnte die Abweichung des Abbaumechanismus von dem bisher angenommenen in doppelter Weise erfolgen, sowohl in der primären Oxydation als auch nach normalem Eintritt des p-Hydroxyls in dem weiteren Verlauf der Oxydation.

Im zweiten Abschnitt konnten wir zeigen, daß p-Oxy-m-Methylphenylalanin vom Normalen wie vom Alkaptonuriker zum größten Teil zerstört wird, ohne daß beim Alkaptonuriker ein Hydrochinonderivat entsteht. Wie Dakin und wir an den Tolyllalaninen gezeigt haben, daß die erste Oxydation nicht nur an p-Stellung, sondern auch anderweitig erfolgen kann, so ergibt sich aus diesem Versuch mit dem m-Methyltyrosin, daß nach eingetretener p-Oxydation immer noch neben dem nachgewiesenen Weg über das Hydrochinonderivat ein anderer Abbauweg selbst für den Alkaptonuriker möglich ist und sogar als Hauptabbaumechanismus dienen kann.

Dieser Abbaumechanismus ist, wie an der p-Oxyphenylbrenztraubensäure gezeigt wird, selbst beim Alkaptonuriker

auch für normale Abbauzwischenprodukte möglich; es ist also bei dieser Stoffwechselstörung auch eine Verbrennung der normalen aromatischen Aminosäuren möglich, auf anderen Wegen als über die Homogentisinsäure.

Im vierten Abschnitt haben wir versucht, die Annahme eines Chinols als Zwischenprodukt bei der Entstehung der Homogentisinsäure durch den Nachweis entsprechender Umwandlungen einfacher Chinole im Tierkörper zu stützen. Es konnte aber weder beim normalen Hund noch beim Alkaptonuriker eine Verbrennung oder eine Hydrochinonbildung festgestellt werden. Dieses negative Resultat kann aber wegen des Fehlens der dem Organismus angepaßten dreigliedrigen Seitenkette in den verfütterten Chinolen nicht als Gegenbeweis gegen das Vorkommen solcher Substanzen als intermediäre Stoffwechselprodukte verwertet werden.

Wir haben schließlich entwickelt, daß neben dem Abbauweg über das Hydrochinonderivat in erster Linie die Oxydation des Tyrosins und der p-Oxyphenylbrenztraubensäure zu dem 3,4-Dioxy-, also zu dem Brenzkatechinderivat in Betracht kommt. Die Annahme eines solchen Abbaumechanismus haben wir dadurch gestützt, daß wir zeigen konnten, daß die vom Brenzkatechin sich ableitende Arylaminopropionsäure, das 3,4-Dioxyphenylalanin, im Organismus in demselben Umfange der Verbrennung unterliegt, wie ein normales Stoffwechselzwischenprodukt, die p-Oxyphenylbrenztraubensäure.

Die Resultate unserer Versuche, soweit sie den Abbau aromatischer Aminosäuren nach dem Eintritt der p-ständigen OH-Gruppe betreffen, sowie die daran angeknüpften Vorstellungen über die oxydative Aufspaltung des Benzolrings im Organismus lassen sich in den beigefügten Formeln veranschaulichen. Das damit aufgestellte Abbauschema wollen wir aber vorläufig mehr als Arbeitshypothese denn als Ausdruck für sichergestellte Tatsachen betrachten. In diesem Schema wird auch deutlich, daß die Stoffwechselstörung bei der Alkaptonurie auch nach der Hydroxylierung in p-Stellung nur den einen Weg betrifft, den andern aber offen läßt.

