

# Über das Schicksal der N-freien Abkömmlinge der aromatischen Aminosäuren im normalen Organismus. <sup>1)</sup>

Von

**Akikazu Suwa** aus Japan.

(Aus der II. medizinischen Klinik in München.)

(Der Redaktion zugegangen am 31. März 1911.)

Durch die Untersuchungen von Wolkow und Baumann,<sup>2)</sup> sowie von Langstein und Falta<sup>3)</sup> sind Tyrosin und Phenylalanin als die Muttersubstanzen der bei der Alkaptonurie im Harn ausgeschiedenen Homogentisinsäure erkannt worden. Eine Reihe von Gründen, auf die hier nicht weiter eingegangen werden kann,<sup>4)</sup> spricht für die Annahme, daß die Homogentisinsäure auch im gesunden Organismus als intermediäres Abbauprodukt dieser beiden aromatischen Aminosäuren auftritt.

Die Frage, welche Zwischenprodukte beim Abbau der aromatischen Aminosäuren zu Homogentisinsäure entstehen, ist in Versuchen mit verschiedenen Derivaten des Phenylalanins von Neubauer und Falta<sup>5)</sup> studiert worden. Ihre Versuche schienen für die Annahme zu sprechen, daß die Aminosäuren zunächst durch  $\text{NH}_3$ -Abspaltung in die entsprechenden Oxysäuren übergehen. In diesem Sinne sprach, daß die dem Phenylalanin zugehörige Oxysäure, die Phenyl- $\alpha$ -milchsäure, eben-

<sup>1)</sup> Die Resultate dieser Versuche wurden bereits auf dem VIII. internationalen Physiologenkongress in Wien 1910 kurz mitgeteilt (Diskussion zum Vortrag Prof. Knoop); inzwischen hat Kotake (Diese Zeitschrift, Bd. LXIX, S. 409 [1910]) über ähnliche Untersuchungen berichtet.

<sup>2)</sup> Wolkow und Baumann, Diese Zeitschrift, Bd. XV, S. 266 (1891).

<sup>3)</sup> Langstein und Falta, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 513 (1903).

<sup>4)</sup> S. O. Neubauer in Abderhaldens Biochem. Handlexikon, Bd. IV, 2. Hälfte, S. 360 (1911).

<sup>5)</sup> O. Neubauer und Falta, Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 81 (1904).

falls in Alkapton übergang. Eine weitere Stütze bot die Angabe, daß in manchen Fällen von Alkaptonurie statt der Homogentisinsäure oder neben ihr eine andere Säure von ähnlichen Eigenschaften, die «Uroleucinsäure», ausgeschieden werde, die man als Hydrochinon- $\alpha$ -milchsäure betrachtete.<sup>1)</sup>

Neubauer und Flatow<sup>2)</sup> konnten nun aber durch Synthese der Hydrochinon- $\alpha$ -milchsäure zeigen, daß dieser sogenannten Uroleucinsäure, wenn sie überhaupt als chemisches Individuum existiert, sicher nicht die Formel der Hydrochinonmilchsäure zukommt; und Garrod und Hurlley<sup>3)</sup> hatten bald nachher Gelegenheit, festzustellen, daß ein von Kirk stammendes Präparat von «Uroleucinsäure» im wesentlichen aus unreiner Homogentisinsäure bestand.

War damit der eine wichtige positive Anhaltspunkt für die oben bezeichnete Art der Homogentisinsäurebildung gefallen, so haben die Untersuchungen Neubauers<sup>4)</sup> an den Abkömmlingen des Tyrosins ihre völlige Unhaltbarkeit ergeben. Sie haben gezeigt, daß die dem Tyrosin entsprechende Oxysäure (p-Oxyphenylmilchsäure) kein Alkaptonbildner ist, daß sie also auch kein Zwischenprodukt bei der Homogentisinsäurebildung sein kann. Dagegen hat sich ergeben, daß die dem Tyrosin entsprechende Ketonsäure (Oxyphenylbrenztraubensäure) Homogentisinsäure bildet. Auf Grund dieser und anderer Versuchsergebnisse spricht sich Neubauer dafür aus, daß die Ketonsäuren als die obligaten Zwischenstufen beim Abbau der Aminosäuren aufzufassen sind. Eine weitere Stütze findet dieser Schluß in den Versuchen von Neubauer und Gross,<sup>5)</sup> welche zeigten, daß die künstlich durchblutete Leber aus Oxyphenylbrenztraubensäure reichlich Acetonkörper bildet, wie aus Tyrosin; dagegen

<sup>1)</sup> Kirk, Brit. med. Journal (1886), S. 1017; (1888), S. 232. — Journal of Anat. and Physiol., Bd. XXIII, S. 69.

<sup>2)</sup> O. Neubauer und Flatow, Diese Zeitschrift, Bd. LII, S. 375 (1907).

<sup>3)</sup> A. E. Garrod und Hurlley, Journ. of Physiol., Bd. XXXVI, S. 329 (1907).

<sup>4)</sup> O. Neubauer, D. Arch. f. klin. Med., Bd. XCV, S. 220 (1909).

<sup>5)</sup> O. Neubauer und W. Groß, Diese Zeitschrift, Bd. LXVII, S. 219 (1910).

nicht aus Oxyphenylmilchsäure; dieses Resultat fand durch die Versuche von Schmitz<sup>1)</sup> im wesentlichen Bestätigung.

Zur weiteren Klärung dieser Verhältnisse war es nun wünschenswert, das Verhalten dieser beiden vom Tyrosin sich ableitenden Säuren im normalen Organismus zu untersuchen. Ich habe, einer Anregung von Herrn Dr. Neubauer folgend, zu diesem Zwecke Versuche am Kaninchen und am gesunden Menschen angestellt.

Beim Kaninchen ergab sich, daß nach Verfütterung der Ketonsäure die Menge der ätherlöslichen Säuren des Harns nur in mäßigem Grade anstieg, entsprechend 28% der verabreichten Säure. Unveränderte Säure konnte im Harn nicht nachgewiesen werden; dagegen fand ich geringe Mengen einer Säure von den Eigenschaften der p-Oxyphenylelessigsäure. Nach Verfütterung von racemischer Oxyphenylmilchsäure war dagegen die Menge der ätherlöslichen Säuren bedeutend vermehrt (entspr. 84% der eingeführten Menge). Es gelang, aus dem Harn Oxyphenylmilchsäure, und zwar die rechtsdrehende Modifikation, zu isolieren.

Um einen etwa störenden Einfluß der Darmfäulnis auszuschalten, habe ich beide Säuren Kaninchen auch subcutan beigebracht. Das Ergebnis war in der Hauptsache das gleiche: Die Ketonsäure vermehrte die Menge der ätherlöslichen Säuren nur wenig (14% der eingegebenen Menge), im Harn fand sich etwas Oxyphenylelessigsäure. Die Oxyphenylmilchsäure dagegen ging zu 91% als ätherlösliche Säure und zwar im wesentlichen unverändert in den Harn über; Auftreten einer optisch aktiven Modifikation ließ sich in diesem Falle nicht nachweisen.

Untersuchungen am gesunden Menschen schienen mir deswegen wichtig, weil ja auch die Untersuchungen bei der Alkaptonurie sich nur auf den Menschen beziehen (Alkaptonurie beim Tier ist bisher noch nicht bekannt), und weil gerade solche Abbauprozesse bei verschiedenen Tierarten häufig im Detail verschieden verlaufen. Auch beim Menschen stellte es sich heraus, daß die Hauptmenge der Ketonsäure offenbar

<sup>1)</sup> Schmitz, Biochem. Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 117 (1910).

verbrannt wird; denn die Vermehrung der ätherlöslichen Säuren im Harn entsprach nur 27 resp. 38% der zugeführten Menge. Unveränderte Säure war auch hier nicht nachweisbar. Oxyphenyl-essigsäure konnte nicht isoliert werden. Dagegen zeigte es sich im Gegensatz zu den Resultaten beim Kaninchen, daß die ätherlöslichen organischen Säuren optisch aktiv waren (rechtsdrehend). Es gelang mir auch, eine Säure zu isolieren, die nach ihren Eigenschaften, ihrem Schmelzpunkt und dem Wassergehalt ihres Ca-Salzes, sowie nach ihrer Drehung d-p-Oxyphenylmilchsäure war. Ein Teil der Ketonsäure war also im menschlichen Organismus einer optisch aktiven Reduktion verfallen.

Eine Analogie findet dieser Befund in der Feststellung von Neubauer,<sup>1)</sup> daß Phenylglyoxylsäure im Organismus des Menschen und des Hundes zu aktiver l-Mandelsäure reduziert wird.

Es ist von Interesse, daß diese Reduktion der Oxyphenylbrenztraubensäure im Organismus zu rechtsdrehender Oxyphenylmilchsäure führt, während die bei krankhaften Zuständen ausgeschiedene Oxyphenylmilchsäure die linksdrehende Modifikation ist.<sup>2)</sup> Blendermann<sup>3)</sup> hat nach mehrtägiger Fütterung von Tyrosin bei einem Kaninchen ebenfalls eine Säure gefunden, die er als Oxyphenylmilchsäure ansprach. Nach dem von ihm angegebenen Schmelzpunkt (162—164°) dürfte es sich auch hier nicht um die racemische Säure gehandelt haben, sondern um eine der beiden aktiven Formen und zwar wahrscheinlich, wie auch Kotake<sup>4)</sup> annimmt, um die l-Modifikation; diese könnte durch direkte hydrolytische Desaminierung aus dem l-Tyrosin entstanden sein. Daß die d-Modifikation vorgelegen hat, scheint mir deswegen nicht wahrscheinlich, weil nach meinen Untersuchungen diese Modifikation zwar durch Reduktion der Ketonsäure beim Menschen entstehen kann, aber nicht beim Kaninchen.

<sup>1)</sup> O. Neubauer, D. Arch. f. klin. Med., Bd. XCV, S. 238 (1909).

<sup>2)</sup> S. bei O. Neubauer in Abderhaldens Biochem. Handlexikon. Bd. IV, 2. Hälfte. S. 360 (1911).

<sup>3)</sup> Blendermann, Diese Zeitschrift, Bd. VI, S. 234 (1882).

<sup>4)</sup> Kotake, Diese Zeitschrift, Bd. LXV, S. 397 (1910).

Nach Verabreichung von p-Oxyphenylmilchsäure wurden in dem einen Falle 49%, in dem anderen 76% der gegebenen Menge im Harn ausgeschieden. Auch hier erwiesen sich die ätherlöslichen Säuren als rechtsdrehend, und es gelang die Isolierung von d-p-Oxyphenylmilchsäure. Daraus darf wohl geschlossen werden, daß die dem natürlichen Tyrosin entsprechende linksdrehende Modifikation im Körper doch zu einem gewissen Teile zerstört wird. Auf welchem Wege diese Zerstörung stattfindet, ist noch nicht festgestellt; die Vermutung liegt nahe, daß eine Oxydation zu Ketonsäure die weitere Verbrennung einleitet.

Meine Untersuchungen zeigen also, daß die dem Tyrosin entsprechende Ketonsäure vom gesunden Menschen beträchtlich besser verbrannt wird als die Oxy-säure. Ich glaube, daß dieses Ergebnis einen neuen Beleg dafür liefert, daß die am Alkaptonpatienten und an der künstlich durchbluteten Leber gewonnenen Resultate bezüglich des intermediären Auftretens von Ketonsäure beim Tyrosinabbau auch für den normalen intakten Organismus Geltung haben.

Beim Phenylalanin liegt die Sache weniger einfach. Hier hat sich in den Versuchen von Neubauer und Falta<sup>1)</sup> nicht nur die Ketonsäure, sondern auch die Oxysäure als Alkaptonbildner erwiesen. Doch hat sich gezeigt, daß aus der Ketonsäure die Homogentisinsäurebildung quantitativ erfolgt, während die Oxysäure nur zu rund 50% Alkaptonsäure lieferte; dasselbe Resultat hatte Neubauer<sup>2)</sup> bei der Wiederholung des Versuchs. Nach den Versuchen von Embden, Salomon und Schmidt<sup>3)</sup> liefert ferner die dem Phenylalanin entsprechende Oxysäure ebenso Acetonkörper in der künstlich durchbluteten Leber wie das Phenylalanin selbst; die Ketonsäure ist in dieser Weise noch nicht untersucht. Ferner hat Knoop

<sup>1)</sup> O. Neubauer und Falta, Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 81 (1904).

<sup>2)</sup> O. Neubauer, D. Arch. f. klin. Med., Bd. XCV, S. 256 (1909).

<sup>3)</sup> Embden, Salomon und Schmidt, Hofmeisters Beiträge, Bd. VIII, S. 9 (1906).

festgestellt, daß sowohl die Ketonsäure als auch die Oxysäure im Organismus des Kaninchens verbrannt werden; doch gibt er an,<sup>1)</sup> daß man nach Verabreichung der Oxysäure eher unverändertes Material aus dem Harn zurückgewinnen konnte, als nach der Ketonsäure, was mit einer Angabe Neubauers<sup>2)</sup> übereinstimmt.

Auch bei diesen Abkömmlingen des Phenylalanins schienen mir Untersuchungen über ihr Schicksal im gesunden menschlichen Organismus wünschenswert.

Von der verabreichten Ketonsäure wurden nur 33,6 bzw. 21,6% als ätherlösliche Säure im Harn wiedergefunden. Aus dem Ätherextrakt des Harnes konnte unveränderte Substanz gewonnen werden. Die Mutterlauge erwies sich als linksdrehend; nach Analogie des Versuches mit Oxyphenylbrenztraubensäure ist es nicht unwahrscheinlich, daß hier durch Reduktion der Ketonsäure l-Phenylmilchsäure entstanden war; doch war die Reindarstellung der Substanz wegen ihrer geringen Menge nicht möglich.

Die Phenyl- $\alpha$ -Milchsäure erwies sich als ziemlich gut verbrennlich. Die Vermehrung der ätherlöslichen Säuren des Harns machte 57,1 resp. 49,6% der gegebenen Menge aus. Aus dem Ätherextrakt wurde Phenylmilchsäure gewonnen, die bei der optischen Untersuchung links drehte. Die d-Modifikation war also besser angegriffen worden als die l-Form. Da es bisher noch nicht bekannt ist, ob die linksdrehende Phenylmilchsäure dem (natürlich vorkommenden) l-Phenylalanin oder dem d-Phenylalanin entspricht, so habe ich die beiden aktiven Formen des Phenylalanins nach Emil Fischer und Schöller<sup>3)</sup> dargestellt und durch Behandlung mit salpetriger Säure desaminiert. Ich habe dabei aus dem d-Phenylalanin die rechtsdrehende, aus dem l-Phenylalanin die linksdrehende Phenylmilchsäure erhalten. Die spezifische Drehung habe ich

<sup>1)</sup> Knoop, Der Abbau aromat. Fettsäuren im Tierkörper. Freiburg 1904. — Diese Zeitschrift, Bd. LXVII, S. 489 (1910).

<sup>2)</sup> O. Neubauer und Falta, Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 96 (Anm.) (1904).

<sup>3)</sup> E. Fischer und Schöller, Liebigs Ann., Bd. CCCLVII, S. 1.

zu  $+$  resp.  $-19,7^{\circ}$  gefunden. Da jedoch die verwendeten Phenylalaninpräparate optisch nicht ganz rein waren, und auch bei der Desaminierung eine teilweise Racemisierung nicht ausgeschlossen ist, so liegt die spezifische Drehung der reinen aktiven Phenylmilchsäure vielleicht höher. Ferner ist die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß bei der Desaminierung die Waldensche Umkehrung der Drehungsrichtung eintritt. Unter der Voraussetzung, daß dies nicht der Fall ist, würde im vorliegenden Falle die der natürlichen Aminosäure entsprechende linksdrehende Modifikation der Phenylmilchsäure schlechter verbrannt worden sein als die rechtsdrehende. Diese Erfahrung steht in einem gewissen Gegensatz zu den sonstigen Erfahrungen, speziell auch zu den beim Tyrosin gewonnenen Ergebnissen.

## Experimenteller Teil.

### I. Versuche mit p-Oxyphenylbrenztraubensäure und p-Oxyphenylmilchsäure.

Die Darstellung der p-Oxyphenylbrenztraubensäure erfolgte nach den Angaben von Neubauer und Fromherz.<sup>1)</sup> Das verwendete Produkt zeigte einen Schmelzpunkt von  $220^{\circ}$ .

Die p-Oxyphenylmilchsäure wurde aus der Ketonsäure durch Reduktion mit Natriumamalgam in der Kälte, Ansäuern und Extrahieren mit Äther erhalten; sie enthielt  $\frac{1}{2}$  Molekül Krystallwasser, schmolz lufttrocken bei  $115^{\circ}$ , wasserfrei bei  $140^{\circ}$ .

### A. Verfütterungsversuche beim Kaninchen.

Bei einem 3,130 kg schweren, mit Hafer gefütterten Kaninchen wurde der Harn in 24-stündigen Perioden gesammelt (Ausdrücken der Blase); die Menge der ätherlöslichen Säuren wurde durch wiederholtes (mindestens 10maliges) Ausschütteln des durch Salzsäure angesäuerten, mit Ammonsulfat fast gesättigten Harnes mit Äther und Titration des Ätherrückstandes mit  $\frac{n}{10}$  Natronlauge unter Verwendung von Phenolphthalein als Indikator bestimmt.

<sup>1)</sup> O. Neubauer und Fromherz, Diese Zeitschrift, Bd. LXX, S. 326 (1911).

Am 2. Versuchstage erhielt das Tier mit Schlundsonde 2 g p-Oxyphenylbrenztraubensäure, am 5. Tage ebensoviel p-Oxyphenyl- $\alpha$ -milchsäure, beide als Na-Salz.

Ver- suchs- tag	Gegebene Substanz (per os)	Harn- menge in ccm	Spez. Ge- wicht	Ätherlös- liche Säuren in ccm $n_{10}$ -Lösung	Bemerkungen
1.	—	106	1016	11,9	
2.	p-Oxyphenylbrenz- traubensäure 2 g entspr. 111 ccm $n_{10}$ -Lösung	111	1016	43,3	Ätherlösl. Säuren, in 10 ccm gelöst, drehen im 2 dm-Rohr — 0,04° p-Oxyphenyl- essigsäure isoliert
3.	—	104	1014	12,3	
4.	—	95	1016	11,4	
5.	p-Oxyphenyl- $\alpha$ -milch- säure 2 g entspr. 104,9 ccm $n_{10}$ -Lösung	138	1020	100,7	Ätherlösl. Säuren, in 20 ccm gelöst, drehen im 2 dm-Rohr + 0,05° Rechtsdreh. p-Oxy- phenyl- $\alpha$ -milchsäure isoliert
6.	—	93	1016	14,9	
7.	—	90	1013	11,7	

Der durchschnittliche Wert für die ätherlöslichen Säuren beträgt an den Normaltagen 12,4 ccm  $n_{10}$  Normallösung.

Am Tage der Verabreichung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure stieg ihre Menge nur in mäßigem Grade an, um 30,9 ccm  $n_{10}$ -Lösung; das entspricht einer Ausscheidung von 28% der zugeführten Substanz in Form von ätherlöslichen Säuren. Zur genaueren Untersuchung wurde die titrierte Lösung auf dem Wasserbade eingedampft, mit Salzsäure angesäuert und die Säuren nochmals mit Äther erschöpfend extrahiert. Der Rückstand dieser Ätherlösung wurde dann in 10 ccm Wasser gelöst, ein Teil davon im 2 dm-Rohr polarisiert; er drehte sehr schwach nach links — 0,04°. Diese Flüssigkeit gab mit Millons Reagens in der Kälte eine tiefrote Färbung. Die Reaktionen auf p-Oxyphenylbrenztraubensäure, die Reduktionsprobe mit Fehlings Lösung, Phenylhydrazinprobe und Eisenchloridprobe fielen alle negativ aus. Die Flüssigkeit wurde mit wenig Tierkohle entfärbt und auf dem Wasserbade auf ein



kleines Volumen eingedampft. Beim Stehen in der Kälte schieden sich weiße Krystalle vom Schmelzpunkt der p-Oxyphenylessigsäure,  $145^{\circ}$  ab. Die Ausbeute daran betrug nur 0,05 g. Sie lösten sich leicht in Wasser, Alkohol und Äther, gaben in wässriger Lösung intensive Millonsche Reaktion. Weil die Ausbeute dieser Substanz zu einer Verbrennung nicht ausreichte, wurde sie mit synthetisch dargestellter p-Oxyphenylessigsäure gemischt und die Schmelzpunktbestimmung vorgenommen. Schmelzpunkt  $145^{\circ}$ .

Am Tage der Zufuhr von p-Oxyphenyl- $\alpha$ -milchsäure stieg die Menge der ätherlöslichen Säuren im Harn sehr beträchtlich an (88,3 ccm  $n_{10}$ -Lösung), entsprechend 84% der verfütterten Substanz. Nach der Titration wurde die wässrige Lösung wie oben weiter behandelt. Der Rückstand der Ätherlösung, in 20 ccm Wasser gelöst, drehte im 2 dm-Rohr schwach rechts  $+ 0,05$ .

Beim Eindampfen der wässrigen Lösung schieden sich 1,5 g einer Säure ab, die nach ihren Eigenschaften p-Oxyphenylmilchsäure war. Schmelzpunkt  $118^{\circ}$ .

0,0469 g Substanz in 3,8201 g Wasser gelöst, im 2 dm-Rohr  $+ 0,05$ .  $[\alpha]_{20}^D = + 2,0^{\circ}$ .

Die Säure wurde aus Wasser umkrystallisiert. Schmelzpunkt  $120^{\circ}$ . 0,0448 g in 4,0525 g Wasser, im 2 dm-Rohr  $+ 0,10^{\circ}$ .  $[\alpha]_{20}^D = + 4,5^{\circ}$ .

Nach nochmaligem Umkrystallisieren stieg ihr Schmelzpunkt auf  $167-168^{\circ}$ , aber das Drehungsvermögen blieb viel schwächer als das der reinen d-Säure.

0,0340 g Substanz in 3,72129 g Wasser gelöst, im 2 dm-Rohr  $+ 0,20$ .  $[\alpha]_{20}^D = + 10,9^{\circ}$ .

## B. Injektionsversuche beim Kaninchen.

Demselben Tier, das zum Verfütterungsversuche gedient hatte, wurden die Säuren als Na-Salze in 3 Portionen subcutan injiziert. Die Verarbeitung der Harne geschah wie oben angegeben.

Ver- suchs- tag	Gegebene Substanz (subcutan)	Harn- menge in ccm	Spez. Ge- wicht	Ätherlös- liche Säure in ccm $n_{10}$ -Lösung	Bemerkungen
1.	—	96	1011	12.1	
2.	p-Oxyphenylbrenz- traubensäure 2 g entspr. 111 ccm $n_{10}$ -Lösung	100	1024	30.2	Ätherlösliche Säuren. in 10 ccm gelöst. drehen im 2 dm-Rohr — 0,05°
3.	—	89	1021	15.4	
4.	—	88	1023	14.8	
5.	p-Oxyphenylmilch- säure 2 g entspr. 104.7 ccm $n_{10}$ -Lösung	106	1024	109.5	Ätherlösliche Säuren. in 20 ccm gelöst. drehen im 2 dm-Rohr — 0,05°
6.	—	85	1022	12.9	
7.	—	96	1016	15.7	

Durchschnittlicher Wert für die ätherlöslichen Säuren an den Normaltagen = 14,2 ccm  $n_{10}$ -Lösung.

Die injizierte Ketonsäure verursachte also nur eine Steigerung der ätherlöslichen Säuren um 16,0 ccm  $n_{10}$ -Lösung entsprechend 14% der Substanz; darnach darf man wohl annehmen, daß ca. 84% der gegebenen Ketonsäure verbrannt worden sind.

Die wässrige Lösung des Ätherextraktes drehte die Polarisationssebene schwach nach links. Die Reaktionen (außer Millons-Probe) auf Ketonsäure waren negativ. Beim Eindampfen dieser wässrigen Lösung schieden sich Krystalle vom Schmelzpunkt 187° ab, denen Millons Probe fehlte. Die Ausbeute betrug 0,08 g. Die Schmelzpunktbestimmung eines Gemisches dieser Säure mit reiner Hippursäure konnte sie identifizieren. Schmelzpunkt 187°.

Aus der Mutterlauge der Hippursäure schieden sich allmählich andere Krystalle ab. Sie zeigten nach der Umkrystallisation aus Wasser den Schmelzpunkt 145°. Millons-Probe positiv.

## C. Versuche am Menschen.

## Versuch 1 (Selbstversuch).

30 Jahre alter gesunder Mann, bei gemischter Kost. Der Harn wurde in 24stündigen Perioden gesammelt, ein Teil (meist 500 ccm) analog wie der Kaninchenharn untersucht, die erhaltenen Werte auf die Tagesmenge umgerechnet. Der übrige Teil des Harns wurde einfach auf dem Wasserbade eingedampft und nach dem Ansäuern mit Äther extrahiert. Der Rückstand der Ätherlösung wurde mit dem der obigen 500 ccm vereinigt und polarisiert.

Am 2. Versuchstage wurden 5 g der Ketonsäure als Natriumsalz in wässriger Lösung in 3 Portionen eingenommen, ohne Störung des Wohlbefindens; am 5. Tage ebenso 5 g der Oxysäure.

Ver- suchs- tag	Gegebene Substanz (per os).	Harn- menge in ccm	Spez. Ge- wicht	Ätherlös- liche Säure in ccm $n_{10}$ -Lösung	Bemerkungen
1.	—	1260	1020	50.6	
2.	p-Oxyphenylbrenz- traubensäure 5 g entspr. 277.7 ccm $n_{10}$ -Lösung	1280	1022	160.7	Ätherlösl. Säuren. in 20 ccm gelöst, drehen im 2 dm-Rohr $+0.35^{\circ}$ d-p-Oxyphenyl- milchsäure isoliert
3.	—	1542	1019	60.6	
4.	—	1775	1014	48.9	
5.	p-Oxyphenylmilch- säure 5 g entspr. 261.7 ccm $n_{10}$ -Lösung	1108	1022	252.5	Ätherlösl. Säuren. in 30 ccm gelöst, drehen im 2 dm-Rohr $+0.45^{\circ}$ d-p-Oxyphenyl- milchsäure isoliert
6.	—	1341	1021	57.1	

Der Wert für die Menge der ätherlöslichen Säuren berechnet sich an den Normaltagen im Durchschnitt zu 54,4 ccm  $n_{10}$ -Lösung. Am Tage der Ketonsäureeinnahme stieg dieser Wert um 106,0 ccm, entsprechend 38% der genommenen Dose.

Die Reaktionen auf unveränderte Ketonsäure fielen negativ aus. Die wässrige Lösung der Säuren zeigte eine mäßige Rechtsdrehung ( $+0,35^{\circ}$  in 20 ccm, 2 dm-Rohr).

Beim Einengen dieser wässerigen Lösung schieden sich nadelförmige Krystalle ab; die rohe Ausbeute betrug 0,25 g. Sie schmolzen im unreinen Zustand bei  $115^{\circ}$ , nach einmaliger Umkrystallisation aus Wasser bei  $164^{\circ}$ , nach nochmaliger Umkrystallisation bei  $167-168^{\circ}$ .

0,0525 g Substanz in 4,1475 g Wasser gelöst, drehten in 2 dm-Rohr  $+ 0,45^{\circ}$ .  $[\alpha]_D = + 17,5^{\circ}$ .

0,1196 g Substanz verloren bei  $110-115^{\circ}$  0,0057 g  $H_2O$ .

Berechnet für  $C_9H_{10}O_4 + \frac{1}{2} H_2O$ : 4,71%

Gefunden: 4,76%.

Die Säure wurde in Wasser gelöst, mit frisch gefälltem kohlenurem Calcium digeriert und filtriert. Das Filtrat wurde auf dem Wasserbade eingengt, das ausgeschiedene Calciumsalz einigemal aus Wasser umkrystallisiert.

0,1240 g Substanz verloren bei  $115^{\circ}$ : 0,0208 g  $H_2O$ .

Berechnet für  $(C_9H_9O_4)_2Ca + 4\frac{1}{2} H_2O$ : 16,77%

Gefunden: 16,78%.

In dem nach Einnahme von 5 g der Oxysäure entleerten Harn war die Menge der ätherlöslichen Säuren entsprechend 194,8 ccm  $n/10$ -Lösung = 76% der eingegebenen Substanz vermehrt. Die vereinigten Ätherextrakte, in 30 ccm Wasser gelöst, zeigten im 2 dm-Rohr eine Rechtsdrehung =  $+ 0,45^{\circ}$ . Durch Eindampfen dieser Lösung wurden 3,5 g Oxyphenylmilchsäure vom Schmelzpunkt  $115^{\circ}$  erhalten. Durch wiederholtes Umkrystallisieren aus Wasser stieg der Schmelzpunkt (unter großen Verlusten an Substanz) auf  $167-168^{\circ}$ .

0,1356 g Substanz in 12,8104 g Wasser gelöst, drehen im 2 dm-Rohr  $+ 0,37^{\circ}$ .  $[\alpha]_D = + 17,5^{\circ}$ .

Die Säure verlor bei  $105^{\circ}$  Krystallwasser. 0,1513 g Substanz verlor 0,0068 g  $H_2O$ .

Berechnet für  $C_9H_{10}O_4 + \frac{1}{2} H_2O$ : 4,7%

Gefunden: 4,5%.

#### Verbrennung:

0,1387 g Substanz liefern 0,3022 g  $CO_2$  und 0,0687 g  $H_2O$ .

Berechnet für  $C_9H_{10}O_4$ : C = 59,32% H = 5,54%

Gefunden: C = 59,42% H = 5,53%.

Ferner wurde das Ca-Salz dargestellt. 0,1440 g verloren bei 110—115° 0,0244 g Wasser = 16,94%.

Berechnet für  $(C_9H_9O_4)_2Ca + 4\frac{1}{2} H_2O = 16,77\%$ .

Die reine d-Säure löst sich in kaltem Wasser schwieriger als die racemische, aber leicht in warmem Wasser, Alkohol und Äther. Sie krystallisiert in langen Nadeln aus der wässrigen Lösung.

Versuch 2. Einem zweiten, 25 Jahre alten Manne wurden 7 g der beiden Säuren als Natriumsalze in 3 Portionen pro Tag gegeben. Die Urine wurden wie oben weiter untersucht.

Ver- suchs- tag	Gegebene Substanz (per os)	Harn- menge in ccm	Spez. Ge- wicht	Ätherlös- liche Säure in ccm n/10-Lösung	Bemerkungen
1.	—	1310	1018	34,5	
2.	p-Oxyphenylbrenz- traubensäure 7 g entspr. 388,8 ccm n/10-Lösung	1283	1018	143,6	Ätherlösl. Säuren, in 15 ccm gelöst, drehen im 2 dm-Rohr + 0,10° d-p-Oxyphenyl- milchsäure isoliert
3.	—	1265	1015	39,1	
4.	p-Oxyphenylmilch- säure 7 g entspr. 366,5 ccm n/10-Lösung	1055	1020	218,8	Ätherlösl. Säuren, in 20 ccm gelöst, drehen im 2 dm-Rohr + 0,40° d-p-Oxyphenyl- milchsäure isoliert
5.	—	1312	1017	42,9	

Mittelwert für die ätherlöslichen Säuren an den Normal-  
tagen 38,9 ccm n/10-Säure.

Die Acidität der in Äther löslichen Säuren stieg am Tage der Ketonsäurezugabe nur mäßig, um 27% der zugeführten Säuremenge. Die gesamten Ätherrückstände drehten in 20 ccm wässriger Lösung im 2 dm-Rohr + 0,10°. Die Reduktionsprobe, Phenylhydrazinprobe und Eisenchloridprobe waren negativ, die Millonsche Probe positiv.

Durch Eindampfen der wässrigen Lösung schieden sich Krystalle vom Schmelzpunkt 187° ab. Sie lösten sich schwer in kaltem Wasser, ziemlich leicht aber in heißem. Millons

Probe war negativ. Sie wurden mit reiner Hippursäure gemischt, der Schmelzpunkt blieb unverändert.

Aus der Mutterlauge der Hippursäure ließen sich nach einigen Tagen Krystalle gewinnen; sie schmolzen bei  $115^{\circ}$ . Ausbeute 0,1 g. Nach einmaligem Umkrystallisieren stieg ihr Schmelzpunkt auf  $167-168^{\circ}$ .

0,0570 g Substanz in 3,7778 g  $H_2O$  gelöst, drehten im 2 dm-Rohr  $+ 0,53^{\circ}$ .  $[\alpha]_D = + 17,6^{\circ}$ .

In dem Urin des Oxysäuretages wurden 49% der zugefügten Säure wiedergefunden. 20 ccm der wässerigen Lösung der Säuren drehten im 2 dm-Rohr nach rechts  $+ 0,40^{\circ}$ .

Die Ausbeute betrug 3,2 g. Durch zweimaliges Umkrystallisieren ließ sich die d-Säure vom Schmelzpunkt  $167-168^{\circ}$  von der racemischen Säure trennen.

0,1188 g Substanz, in 11,9346 g Wasser gelöst, drehen im 2 dm-Rohr  $+ 0,35^{\circ}$ . Daraus berechnet  $[\alpha]_D = + 17,6^{\circ}$ .

0,1528 g Substanz verloren bei  $110-115^{\circ}$  0,0072 g  $H_2O = 4,7\%$ .

Berechnet für  $C_9H_{10}O_4 + \frac{1}{2} H_2O$ : 4,71%.

0,2461 g Ca-Salz verloren bei  $110-115^{\circ}$  0,0416 g  $H_2O = 16,9\%$ .

Berechnet für  $(C_9H_9O_4)_2Ca + 4\frac{1}{2} H_2O$ : 16,77%.

## II. Versuche mit Phenylbrenztraubensäure und Phenyl- $\alpha$ -milchsäure (beim Menschen).

Versuch 1. Von einem 30 Jahre alten Manne (Selbstversuch) wurden 8 g Phenylbrenztraubensäure und 7 g Phenylmilchsäure, die erste Säure nach Plöchl, Erlenmeyer und Lipp<sup>1)</sup> dargestellt (Schmelzpunkt  $145^{\circ}$ ), die zweite, durch die Reduktion aus der ersten gewonnen (Schmelzpunkt  $95^{\circ}$ ), als Natriumsalze in 3 Portionen pro Tag genommen. In 300 ccm des Urins wurden, wie beim vorigen Versuch, die ätherlöslichen Säuren bestimmt. Der übrige Teil des Harns wurde einfach auf dem Wasserbade eingeengt, angesäuert, mit

<sup>1)</sup> Plöchl. Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XVI, S. 2815 (1883). — Erlenmeyer und Lipp. Liebigs Ann., Bd. CCLXXI, S. 137 (1892).

Äther extrahiert, und die in Äther löslichen Säuren schließlich mit denen aus den 300 ccm vereinigt.

Ver- suchs- tag	Gegebene Substanz (per os)	Harn- menge in ccm	Spez. Ge- wicht	Ätherlös- liche Säure in ccm $n_{10}$ -Lösung	Bemerkungen
1.	—	1120	1022	45.1	
2.	Phenylbrenztrauben- säure 8 g entspr. 487,8 ccm $n_{10}$ -Lösung	1185	1026	214.5	Ätherlösliche Säuren, in 15 ccm gelöst, drehen im 2 dm-Rohr — 0,20° Hippursäure isoliert
3.	—	1024	1024	52.4	
4.	Phenylmilchsäure 8 g entspr. 421.7 ccm $n_{10}$ -Lösung	1175	1022	291.6	Ätherlösl. Säuren, in 20 ccm gelöst, drehen im 2 dm-Rohr — 0,30° l-Phenylmilchsäure isoliert
5.	—	1278	1022	54.2	

Durchschnittswert für die ätherlöslichen Säuren an den Normaltagen = 50,6 ccm  $n_{10}$ -Säure.

Nach der Einnahme von Phenylbrenztraubensäure vermehrte sich ihre Menge um 163,9 ccm, entsprechend 33,6% der Substanz.

Die wässrige Lösung der Säuren drehte nach links. Sie wurde dann mit Tierkohle entfärbt und auf dem Wasserbade eingeeengt. Nach 12 Stunden schieden sich weiße Krystalle aus; die Ausbeute betrug 0,5 g. Sie schmolz bei 187° und enthielt nach Kjeldahl 7,87% N. Für Hippursäure berechnet sich 7,82%.

Die Mutterlauge der Hippursäure wurde noch etwas weiter eingeeengt; dabei schied sich unveränderte Phenylbrenztraubensäure aus. Die Ausbeute betrug ca. 1,0 g. Schmelzpunkt 145°.

Die Mutterlauge dieser Säure drehte noch nach links. Beim weiteren Eindampfen schieden sich wieder Krystalle ab, aber sie zeigten mit Eisenchloridlösung noch starke Grünfärbung. Um sie von der beigemischten Phenylbrenztraubensäure zu trennen, wurden die Krystalle in Äther gelöst, die Ätherlösung mit Natriumbisulfitlösung stark geschüttelt. Die ätherische Schicht wurde dann abgetrennt, der Äther verjagt.

Der Rückstand war aber nur gering, und die Reingewinnung der linksdrehenden Substanz daher unmöglich.

In dem Versuche mit Phenyl- $\alpha$ -milchsäure stiegen die ätherischen Säuren entsprechend 421 ccm  $n_{10}$ -Säure = 58,5% der gegebenen Säure; die Säuren aus 300 ccm Harn drehten, in 20 ccm Wasser gelöst, im 2 dm-Rohr — 0,30°.

Nach dem Einengen auf dem Wasserbade schieden sich nadelförmige Krystalle ab, aus dem ganzen Harn ca. 2,5 g. Schmelzpunkt 121°. Sie waren schwer löslich in kaltem, leicht in heißem Wasser, Alkohol und Äther. Die wässrige Lösung der Säure drehte die Polarisationssebene nach links.

0,1530 g Substanz, gelöst in 13,8772 g Wasser, im 2 dm-Rohr — 0,43°, also  $[\alpha]_D$  — 19,5°.

Der Schmelzpunkt und die spezifische Drehung stimmen mit denen der synthetisch dargestellten l-Phenylmilchsäure (s. unten) überein.

Versuch 2. Einem 32 Jahre alten Mann wurden 10 g Phenylbrenztraubensäure und 7 g Phenylmilchsäure als Natriumsalz in 3 Portionen pro Tag gegeben und die in 24 Stunden gesammelten Urine wurden in der angegebenen Weise behandelt.

Ver- suchs- tag	Gegebene Substanz (per os)	Harn- menge in ccm	Spez. Ge- wicht	Ätherlös- liche Säure in ccm $n_{10}$ -Lösung	Bemerkungen
1.	—	1195	1016	45,2	
2.	Phenylbrenztrauben- säure 10 g entspr. 609,7 ccm $n_{10}$ -Lösung	1148	1018	178,3	Ätherlösliche Säuren. in 15 ccm gelöst, drehen im 2 dm-Rohr — 0,30°
3.	—	1080	1018	54,3	
4.	Phenylmilchsäure 7 g entspr. 421,7 ccm $n_{10}$ -Lösung	1218	1018	255,7	Ätherlösl. Säuren. in 20 ccm gelöst, drehen im 2 dm-Rohr — 0,30° l-Phenylmilchsäure isoliert
5.	—	915	1022	39,5	

Durchschnittswert für die ätherlöslichen Säuren an den Normaltagen 46,4 ccm  $n_{10}$ -Säure.



Die Acidität der in Äther löslichen Säuren stieg bei Versuch mit Phenylbrenztraubensäure um ca. 21,6% der Menge der zugeführten Säure. Die Säuren wurden hier auch wie vorher behandelt und ca. 1,5 g Phenylbrenztraubensäure isoliert. Die Mutterlauge enthielt eine andere Substanz, die die Polarisationslichtebene nach links drehte, doch gelang auch hier die Reindarstellung nicht, wegen der geringen Menge des Materiales und der Beimischung von Phenylbrenztraubensäure.

Durch Eingabe von Phenylmilchsäure vermehrte sich die Acidität der ätherlöslichen Säuren entsprechend 49,6% der zugeführten Substanz. Die in Äther löslichen Säuren aus 300 ccm Harn drehten in 20 ccm wässriger Lösung. — 0,35°.

Aus dem gesamten Harn wurden ca. 2 g Krystalle gewonnen. Sie schmolzen bei 121°, krystallisierten aus wässriger Lösung in schönen Nadeln.

0,1100 g Substanz gelöst in 10,2947 g Wasser im 2 dm-Rohr — 0,42.  $[\alpha]_D = -19,6^\circ$ .

Ihr Schmelzpunkt und spezifischer Drehungsgrad stimmt mit denen der l-Phenylmilchsäure überein.

### Darstellung von l- und d-Phenylmilchsäure.

5 g l-Phenylalanin, welche nach E. Fischer und Schöller dargestellt worden waren, wurden in 150 ccm heißem Wasser gelöst und nach dem Erkalten dieser Lösung 33 ccm Normalschwefelsäure hinzugefügt. Dieser Lösung wurden bei 0° 3,9 g Baryumnitrit portionsweise in ca. 1 Stunde zugegeben und dazwischen stark geschüttelt. Das Ganze wurde dann 12 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, darauf von Baryumsulfat abgesaugt, mit Schwefelsäure angesäuert und mit Äther 12 mal extrahiert. Der Rückstand der Ätherlösung wurde in 10 Teilen Wasser heiß gelöst, mit wenig Tierkohle entfärbt, das Filtrat davon auf dem Wasserbade bis auf ein Drittel des Volumens eingengt. Sofort nach dem Erkalten der Lösung schieden sich schöne lange Nadeln ab, die am nächsten Morgen abgesaugt wurden.

Die Ausbeute betrug ca. 2,8 g = 56% der Theorie. Schmelzpunkt 121° (korr.).

0,1615 Substanz gaben 0,3870 CO<sub>2</sub> und 0,0894 H<sub>2</sub>O.

Berechnet für C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>:                      Gefunden:

C 65,04%, H 6,07%.                      C 65,35%, H 6,19%.

0,2053 g Substanz in 20,0472 g Wasser gelöst, drehen im 2 dm-Rohr — 0,405°. Spezifisches Gewicht der Lösung 1003.

Daraus berechnet  $[\alpha]_{20}^D = -19,71^\circ$ .

0,1946 g Substanz in 19,6128 g Wasser gelöst im 2 dm-Rohr — 0,39°.  $[\alpha]_{20}^D = -19,61^\circ$ .

5 g d-Phenylalanin, daß von der l-Form nach E. Fischer und Schöller getrennt worden war, wurde wie der l-Antipode behandelt. Die Ausbeute an ätherlöslicher Säure 2,6 g = 52% der berechneten Menge. Sie krystallisiert auch aus wässriger Lösung in langen Nadeln vom Schmelzpunkt 121° (korr.).

0,1363 g Substanz in 11,8845 g Wasser gelöst, drehen im 2 dm-Rohr + 0,42°. Spezifisches Gewicht der Lösung 1003.

$[\alpha]_D^{20} = +19,70^\circ$ .

0,1180 g Substanz in 11,6066 g Wasser gelöst im 2 dm-Rohr + 0,40°.  $[\alpha]_D = +19,65^\circ$ .

Die beiden aktiven Säuren lösen sich ziemlich schwer in kaltem, aber leicht in heißem Wasser, Alkohol und Äther.

---