

Über die Nicht-Existenz der «Uroleucinsäure». ¹⁾

Von

Adolf Oswald, Zürich.

(Der Redaktion zugegangen am 17. November 1914.)

Im Jahre 1889 beschrieb Kirk²⁾ unter dem Namen «Uroleucinsäure» eine aus Alkaptonharn gewonnene Säure, welche die spezifischen Eigenschaften des Alkaptonharns in sich barg. Sie schmolz bei «circa» $133,3^{\circ}$ ³⁾ und gab analysenwerte, die auf die empirische Formel $C_9H_{10}O_5$ passten.⁴⁾ Eine nähere Identifizierung hat er nicht vorgenommen. Im Jahre 1891 stellten Wolkow und Baumann⁵⁾ aus dem Harn von an der gleichen Stoffwechselanomalie Leidenden Homogentisinsäure dar, eine durch die Synthese als Hydrochinonessigsäure charakterisierte Säure. Da deren empirische Formel $C_8H_8O_4$ betrug,⁶⁾ und ihr Schmelzpunkt bei 148° lag, so war sie mit jener nicht identisch.

Homogentisinsäure ist bisher in allen Fällen von Alkaptonurie gefunden worden — es sind ca. 75 Fälle in der Literatur beschrieben — Uroleucinsäure dagegen seit der Entdeckung

¹⁾ Diese Untersuchungen sind zum größten Teil seiner Zeit im Agrikulturchemischen Laboratorium der Eidgenössischen Technischen Hochschule angestellt worden. Die letzten Analysen wurden im pharmakologischen Institut ausgeführt.

²⁾ R. Kirk, On a new new acid found in human urine which darkens with alkalis (alcaptonuria), Journ. of Anat. and Physiol, Bd. 23, S. 69 (1889).

³⁾ «about $133,3^{\circ}$ C.»

⁴⁾ C = $54,45\%$, H = $4,98\%$. (Berechnet für $C_9H_{10}O_5$: C = $54,54\%$, H = $5,05\%$).

⁵⁾ M. Wolkow und E. Baumann, Über das Wesen der Alkaptonurie, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 15, S. 228 (1891).

⁶⁾ C = $57,36\%$, H = $5,28\%$. (Berechnet für $C_8H_8O_4$: C = $57,14\%$, H = $4,76\%$).

der Homogentisinsäure nur in zweien. Das eine Mal von Huppert¹⁾ in einer Probe des Kirkschen Originalpräparates, aus dem er allerdings zuvor eine große Menge von Homogentisinsäure gewonnen hatte.²⁾ Das zweite Mal von Langstein und Meyer³⁾ bei einem anderen Alkaptonuriker. Sie fanden sie nach dem Huppertschen Verfahren zeitweise neben Homogentisinsäure, jedoch in so geringer Ausbeute, daß sie nach ihrer Aussage nur für eine Schmelzpunktbestimmung und die Vornahme einiger Reaktionen ausreichte. Eine Elementaranalyse hat Huppert nicht vorgenommen, trotzdem ihm ca. 2 g der Säure zur Verfügung standen, sondern auf Grund einer annähernden Übereinstimmung des Schmelzpunktes seines Körpers mit dem Kirks eine Identität beider ohne weiteres angenommen. Hupperts Körper schmolz bei 131,5°. ⁴⁾ Die Kirksche Elementarformel passte auf eine Trioxyphenylpropionsäure oder eine Hydrochinonmilchsäure. Da er durch Oxydation des methylierten Produktes mittelst Kaliumpermanganates Dimethylgentisinsäure erhielt, genau wie auch bei der Oxydation der methylierten Homogentisinsäure, so nahm Huppert an, die fragliche Säure enthalte im Kern nur zwei alkoholische Hydroxylgruppen und die dritte befinde sich in der Seitenkette. Er erklärte sie darum als Hydrochinonmilchsäure. Eine Prüfung seiner Auffassung durch die synthetische Darstellung hat er nicht vorgenommen. Diese stellten später Neubauer und Flatow⁵⁾ an. Sie fanden dabei, daß synthetisch dargestellte Hydrochinonmilchsäure nicht die gleichen chemischen

¹⁾ Huppert, Über die Alkaptonsäuren, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 23, S. 412 (1897).

²⁾ Huppert (loc. cit.) spricht ganz beiläufig von einem früheren Präparat von Uroleucinsäure, das er dargestellt hätte. Ob das auf einen dritten Fall zu beziehen wäre, ist nicht deutlich ausgesprochen.

³⁾ L. Langstein und E. Meyer, Beitrag zur Kenntnis der Alkaptonurie. Deutsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 78, S. 161 (1903).

⁴⁾ Huppert gibt zwar irrümlicherweise den von Kirk gefundenen Schmelzpunkt als bei 130,3° liegend an. Das andere Präparat Hupperts schmolz nach seiner Angabe bei 133°.

⁵⁾ O. Neubauer und L. Flatow, Synthesen von Alkaptonsäuren, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 52, S. 375 (1907).

Eigenschaften besitzt, wie der von Huppert untersuchte Körper. Damit wurde die Konstitution des letzteren wieder ganz ungewiß. Aufgefallen war schon Huppert und Kirk und später Langstein und Meyer¹⁾, daß der fragliche Körper die Ebene des polarisierten Lichtes nicht drehte, während doch Substanzen mit einem asymmetrischen Kohlenstoffatom, wie Hydrochinonmilchsäure eines besitzt, im Organismus nicht in der Racemform, sondern in einer der beiden aktiven Formen aufzutreten pflegen (bisher nur mit einer einzigen Ausnahme).

In neuerer Zeit ist Uroleucinsäure trotz minutiösen Suchens nicht mehr gefunden worden. Huppert hat sie in einem anderen Fall vergeblich gesucht und nur Homogentisinsäure gefunden. Auch in dem von Langstein und Meyer seiner Zeit untersuchten Fall konnten sie später Neubauer und Falta²⁾ nicht mehr finden.

Durch diese negativen Befunde entstanden allmählich Zweifel an der tatsächlichen Existenz der Uroleucinsäure und sicherlich wären solche schon früher aufgetreten, wenn nicht ein Forscher von der Qualität Hupperts sich so bestimmt im positiven Sinne ausgedrückt hätte. Man mußte sich fragen, ob die vermeintliche Uroleucinsäure nicht eine verunreinigte Homogentisinsäure gewesen sei. Diese Meinung gewann an Boden, als Garrod und Hurthley³⁾ aus dem Harn eines Patienten, aus dem sie nach anderer, zuverlässigerer Methode bei wiederholter, auf einen Zeitraum von mehreren Jahren sich erstreckender Untersuchung umsonst nach Uroleucinsäure gefahndet hatten, nach dem von Kirk befolgten Verfahren ein Präparat erhielten, das dem Kirkschen Körper entsprach. Es schien somit nur die Methodik am Befunde der «Uroleucinsäure» Schuld zu sein. Garrod und Hurthley prüften danach auch den seiner Zeit von Kirk untersuchten Fall, der noch

¹⁾ Loc. cit.

²⁾ Neubauer und Falta, Über das Schicksal einiger aromatischer Säuren bei der Alkaptonurie, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 42, S. 81 (1904).

³⁾ A. E. Garrod und W. H. Hurthley, On the supposed occurrence of uroleucic acid in the urine in some cases of alcaptonuria, Journ. of Physiol. Bd. 36, S. 136 (1907).

am Leben und inzwischen vom Kinde zum Mann herangewachsen war, und fanden mit der von ihnen angewendeten, durchaus einwandfreien Methodik nur Homogentisinsäure und keine weitere Alkaptonsäure, während Kirk seiner Zeit von dem Patienten mühelos große Mengen seiner Säure erhalten hatte. Damit durfte man die Frage nach der Existenz der Uroleucinsäure als im negativem Sinne erledigt betrachten. Trotz alledem blieb aber freilich der Befund Hupperts einer bei 131,5° schmelzenden Säure unaufgeklärt.

Ich habe zufällig den Alkaptonuriker, der s. Z. Langstein und Meyer zu ihren Untersuchungen gedient hatte, unter die Hände bekommen. Der Patient lag auf der hiesigen medizinischen Klinik und Prof. Eichhorst hatte die Liebenswürdigkeit, mir zu gestatten, den Harn von ca. 14 Tagen zu sammeln. Es sei mir erlaubt, auch an dieser Stelle Herrn Prof. Eichhorst hierfür zu danken. Ich habe mir zur Aufgabe gemacht, nochmals zu prüfen, ob sich eventuell «Uroleucinsäure» darin nachweisen ließe, und wenn das nicht der Fall sein sollte, ob sich unter Umständen Anhaltspunkte dafür finden ließen, wie Hupperts Befunde zu erklären seien. Ich will gleich vorwegnehmen, daß ich die Gegenwart eines Stoffes mit den Eigenschaften der Uroleucinsäure in meinem Falle mit Sicherheit habe ausschließen können. Was den zweiten Punkt anbelangt, so erzielte ich bei der Untersuchung von Hupperts Originalpräparaten, zu der ich aus gleich anzuführenden Gründen veranlaßt wurde, höchst unerwartete Resultate, die die Existenz der Uroleucinsäure als nichtig erkennen ließen. Doch will ich in meiner Schilderung dem Gange der Untersuchungen folgen. Sie gestalteten sich folgendermaßen.

Der Harn des Mannes wurde während 16 Tagen gesammelt, und um die Ausbeute an Alkaptonsäure zu vermehren, wurden ihm außer einer eiweißreichen Kost täglich 2—3 g Tyrosin nach der Vorschrift Mittelbachs¹⁾ in zwei resp. drei Gaben mit der Nahrung verabreicht. Der Harn wurde in Tagesportionen verarbeitet und zwar nach dem Ver-

¹⁾ E. Mittelbach, Ein Beitrag zur Kenntnis der Alkaptonurie, Deutsch. Arch. f. klin. Medizin, Bd. 71, S. 50 (1901).

fahren Garrods.¹⁾ Er wurde auf freier Flamme bis beinahe zum Sieden erhitzt und heiß mit je 100 g neutralem Bleiacetat in Substanz versetzt, danach heiß von dem gebildeten Niederschlag abfiltriert und in den Eisschrank gestellt. Nach 24 Stunden wurden die großen, oft zu ausgedehnten Rasen vereinigten Drusen von zentimeterlangen braunen Krystallen von homogentisinsäurem Blei abfiltriert. Zur Identifizierung wurde ein kleiner Teil zu Pulver zerrieben, in Äther aufgeschwemmt und durch Einleiten von Schwefelwasserstoff vom Blei getrennt, das Schwefelblei abfiltriert und die farblose ätherische Lösung an der Luft eindunsten gelassen. Die alsdann ausgeschiedenen Krystalle wurden in Wasser aufgenommen, mit etwas Tierkohle bei mäßigem Erwärmen behandelt und das Filtrat langsam im Vakuum über Schwefelsäure eindunsten gelassen. Es schieden sich schöne Krystalle aus, die, getrocknet und vom Krystallwasser befreit den Schmelzpunkt der Homogentisinsäure zeigten (148°).

Die vom homogentisinsäurem Blei getrennten Mutterlaugen wurden vereinigt, durch Einleiten von Schwefelwasserstoff vom Blei befreit und das Filtrat anfänglich auf dem Wasserbad bei niedriger Temperatur und später im Vakuum bei 40° bis zum dünnflüssigen Sirup eingedunstet. Nach dem Abkühlen wurde der dunkle Sirup mit Äther vielmals ausgeschüttelt und zwar so oft als noch etwas in Lösung ging. Die ätherischen Lösungen ließen beim Eindunsten einen dunkelbraunen, mit langen, nadelförmigen Krystallen untermengten Sirup zurück. In Äther, Äthyl- und Methylalkohol, Essigester ging sowohl Sirup wie Krystalle über, dagegen nahm Benzol nur die Krystalle unter hellkirschroter Färbung nicht aber den Sirup auf. Beim Eintrocknen schieden sich die Krystalle größtenteils als nur noch schwach gefärbte, feste Nadeln aus, während der Farbstoff sich fast vollständig als braune Masse gegen die Peripherie des Krystallbelages verzog. Auch in Chloroform, Schwefelkohlenstoff und Aceton lösten sich die Krystalle leicht,

¹⁾ A. E. Garrod, Alcaptonuria: a simple method for the extraction of homogentisic acid from the urine. Journ. of Physiol. Bd. 23, S. 512 (1899).

dagegen schwer in Wasser, verdünnten Alkalien und Säuren. Bei der Aufnahme in Aceton blieb eine geringe Menge kleiner, weißer, derber Krystalle zurück. Es wurde darum die ganze Portion des Rohproduktes mit Aceton behandelt. Die Gesamtmenge der zurückgebliebenen Krystalle reichte gerade zu einer Schmelzpunktbestimmung aus. Dieser lag bei 115° . Weiteres konnte über diese Fraktion nicht festgestellt werden. Die nach Eindunsten des Acetons sich ausscheidenden Nadeln wurden von anhaftendem Farbstoff durch Behandeln der methyloalkoholischen Lösung mit Tierkohle befreit. Durch Versetzen des Filtrates mit Wasser bis zur beginnenden Trübung schieden sich schneeweise bis zu $2\frac{1}{2}$ cm lange Nadeln aus. Wurde die Fällung rasch vorgenommen, so schlug sich die Substanz dagegen in Form dünner Schuppen nieder. Der Schmelzpunkt lag bei 123° .

Auf diese Weise wurden ziemlich viel Verluste erlitten und da die Ausbeute so wie so nur sehr gering war, mußte ein weniger verlustreicher Weg zur Darstellung eingeschlagen werden. Da sich kein Lösungsmittel finden ließ, das die Krystalle ohne die letzten Verunreinigungen aufnahm, so wurde der Körper mit nur geringen Verlusten auf folgende Weise erhalten. Beim langsamen Eindunsten der benzolischen Lösung in der Glasschale schieden sich die Krystalle in der Mitte der Schale stets schneeweiß aus, während die randständigen Partien allein gefärbt blieben. Es wurden daher stets letztere mit dem Spatel entfernt und abermals in Benzol gelöst, und die gleiche Prozedur so lange wiederholt, bis fast alle Krystalle in schneeweißem Zustande erhalten wurden. Auch das so gewonnene Produkt schmolz bei 123° und stellte lange weiße Nadeln dar. Sie zeigten die oben angegebenen Löslichkeitsverhältnisse. Ihre Menge betrug 0,6 g. Sie waren stickstofffrei. Eine Elementaranalyse ergab Werte für $C_7H_6O_2$.

0,1528 g Substanz = 0,3853 g CO_2 und 0,0676 g H_2O .

Berechnet für $C_7H_6O_2$:

C = 68,85%

H = 4,91%

Gefunden:

68,77%

4,95%.

Somit handelte es sich um Benzoësäure, die wohl durch das lange Einengen auf dem Wasserbade in saurer Lösung aus Hippursäure abgespalten worden war. Ein Gemenge der Krystalle mit käuflicher reiner Benzoësäure schmolz bei 121°.

Aus dem dunkelbraunen Sirup, der Mutterlauge der Benzoësäure, schieden sich keine Homogentisinsäure und auch keine anderen Krystalle mehr aus. Eine als Uroleucinsäure anzusehende Krystallfraktion war nicht erhältlich.

Auf ähnliche Weise, wie soeben beschrieben, hat Huppert seine Uroleucinsäure erhalten, d. h. er schied gleichfalls Homogentisinsäure als Bleisalz mit Bleiacetat aus, entfernte das überschüssige Blei mit Schwefelwasserstoff und schüttelte die eingengten Filtrate mit Äther aus. Dabei schildert er, daß schon in dem bis zum Syrup eingengten Filtrate des Schwefelbleies an der Oberfläche strahlenförmige Krystalle sich ausschieden, die sich dann leicht in Äther lösen. Beim Eindunsten des Äthers gewann er dann das Produkt, das er als Uroleucinsäure ansah.

Es stellte sich nun die Frage, ob Hupperts Uroleucinsäure nicht etwa mit Benzoësäure verunreinigte Homogentisinsäure gewesen sei. Tatsächlich erhielt ich beim Vermischen von zwei Teilen Homogentisinsäure und einem Teil Benzoësäure ein Gemenge, das bei 130° oder 131° schmolz, je nachdem etwas mehr oder weniger Benzoësäure im Vergleiche zur Homogentisinsäure verwendet wurde. Um diese Frage aufzuklären, wandte ich mich an Herrn Prof. v. Zeynek, in dessen Institut seiner persönlichen Mitteilung zufolge die alten Präparate Hupperts aufbewahrt waren. Herr Prof. v. Zeynek stellte mir in sehr lebenswürdiger Weise alle Präparate Hupperts, drei an der Zahl, zur Verfügung. Es sei mir gestattet, ihm auch an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank dafür auszusprechen. Beim Anblick der Präparate fiel mir sogleich die Ähnlichkeit derselben mit verwitterter Homogentisinsäure auf, wie sie beim Stehen an der Luft schon nach einigen Wochen aussieht. Es waren (Präparat I) große milchige, grau-gelblichweiße, opake Krystalle. Die beiden anderen Präparate

stellten nicht charakterische, hellgraubraune Pulver dar. Ihrer Menge nach betrug Präparat I 0,49 g, Präparat II 0,1 g und Präparat III 0,45 g. Präparat I war eigenhändig von Professor v. Zeynek aus den von Huppert signierten Originalfläschchen entnommen und verpackt worden. Präparat II und III befanden sich noch in den von der Hand Hupperts gezeichneten Gläsern, welche seit dessen Tod sollen nie geöffnet worden sein. Bei der Schmelzpunktbestimmung erlebte ich die Überraschung, zu konstatieren, daß Präparat I bei 148° schmolz, während, wie wir gesehen haben, Huppert für die Uroleucinsäure $131,5^{\circ}$ angegeben hatte, Präparat II schmolz bei 149° und Präparat III bei 146° . Da die letzteren gefärbt waren, stellte der etwas abweichende Schmelzpunkt nichts Überraschendes dar.

Nach diesem auffälligen Befunde hatte die zunächst gehegte Auffassung einer Verunreinigung des Präparates mit Benzoësäure nicht viel Wahrscheinlichkeit für sich. Dennoch wurde ein Teil von Präparat I mit Benzol behandelt. Dabei ging aus den zu Pulver zerriebenen Krystallen in Spuren eine hellgraugelbe Substanz über, welche den Schmelzpunkt 148° zeigte. Aus Präparat II ging ebenfalls in Spuren eine Substanz mit dem Schmelzpunkt 147° über, während aus Präparat III, auch nur spurenhaf, eine hellgraugelbe Substanz übergang, welche bei 188° schmolz. Siedendes Benzol nahm eine Substanz auf, welche beim Verdunsten desselben in schönen Kryställchen zurückblieb, die bei 146° schmolzen. Ein Körper vom Schmelzpunkt der Benzoësäure (121°) war nicht erhältlich.

Da Präparat II und III in Pulverform waren, wurde versucht sie zu krystallisieren. Zu diesem Behufe wurden sie in kaltem Wasser aufgenommen, in dem sie sich bis auf vorhandene Filterfasern mit marsalagelber Farbe glatt lösten, und mit etwas Tierkohle bei gelindem erwärmen behandelt. Die hellgelben Filtrate schieden beim spontanen Eindunsten an der Luft schöne Krystalle aus von derselben Form, wie die des Präparates I. Der Schmelzpunkt lag bei beiden nach 24stündigem Trocknen im Vakuum über Schwefelsäure bei 148° .

Zur weiteren Aufklärung wurde Präparat I einer Elementaranalyse unterworfen. Dabei erhielt ich folgende Werte:

0,3617 g Substanz ergaben 0,7540 g CO₂ und 0,1553 g H₂O = 0,2056 g C und 0,0172 g H, somit:

56,84 % C und 4,75 % H.

Berechnet für Homogentisinsäure: 57,14 % C und 4,76 % H.

Damit ist erwiesen, daß die Originalpräparate Hupperts, auf welche sich die Existenz der «Uroleucinsäure» gründet, aus reiner Homogentisinsäure bestanden, und damit ist die Nichtexistenz derselben dargetan.

Da nun Hupperts Originalpräparate aus den Originalpräparaten Kirks stammten und nur dadurch erhalten waren, daß Huppert aus ihnen vorher Homogentisinsäure gewonnen hatte, so ist im weiteren erwiesen, daß auch Kirks Präparate aus Homogentisinsäure bestanden. Damit ist die Lehre von der Existenz der «Uroleucinsäure» auch ihrer letzten Stütze beraubt.

Es blieb nun aufzuklären, wieso das gleiche Präparat in den Händen Hupperts einen niedrigeren Schmelzpunkt ergeben hatte, als in den meinen. Mit Rücksicht darauf, daß Homogentisinsäure leicht in ihr Lakton übergeht, hätte es sein können, daß ein Teil des Präparates sich in dieser Weise umgewandelt hätte. Da das Lakton in kaltem Wasser und Alkohol schwer löslich ist, wurde die Löslichkeit in diesen Solventien geprüft. Alle drei Präparate lösten sich jedoch glatt und leicht darin. Den niedrigen Schmelzpunkt Hupperts kann ich mir nur so erklären — so schwer es auch hält, das für einen Forscher wie Huppert anzunehmen — daß seine Präparate nicht ganz von Krystallwasser befreit waren, welches sie dann im Laufe der Jahre verloren.¹⁾

¹⁾ Ich will nicht unterlassen, noch auf einen Punkt aufmerksam zu machen, den schon Garrod hervorhob. Huppert hatte ohne weiteres für sein Präparat die Zusammensetzung angenommen, die Kirk für seine «Uroleucinsäure» angegeben hatte. Dabei konnte aber sein Präparat, selbst wenn es eine solche gegeben hätte, gar nicht identisch mit dem Kirks sein, denn nach seinem eigenen Befund bestand das Kirksche Originalpräparat, von dem sein eigenes Material herrührte, zu einem großen Teil aus Homogentisinsäure, womit der Rest, den er als «Uroleucinsäure» ansah, eine andere Zusammensetzung hätte haben müssen als Kirks Säure.