

AUSSCHEIDUNG VON *p*-OXYPHENYLESSIGSÄURE NACH BELASTUNG MIT *p*-OXYPHENYLBRENTZTRAUBENSÄURE BEIM KANINCHEN

von

ERNST KIRBERGER UND THEODOR BÜCHER

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Hamburg (Deutschland)

ÜBERSICHT

Frühere Untersuchungen (E. KIRBERGER 1948¹) haben ergeben, dass Kaninchen, welche per os mit *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure belastet werden, beträchtliche Mengen einer Substanz ausscheiden, die zwar noch die Reaktion eines *p*-Oxyphenylderivats (MILLONSche Reaktion) aber keine Ketocarbonsäurereaktion (PENROSE-QUASTELSche Reaktion) mehr gibt. Die Ausscheidungen betragen 30–45% der applizierten Menge (Fig. 1, Tab. I). Belastungen mit *L*-Tyrosin zeigen qualitativ das gleiche Bild; die Ausscheidungen sind allerdings wesentlich geringer (Fig. 3).

Wir haben uns gefragt, welcher chemischen Natur dieses Ausscheidungsprodukt sei. Nach der umfangreichen Literatur über den Abbau der aromatischen Aminosäuren war in erster Linie an *p*-Oxyphenylmilchsäure^{2–7} und die Enolform der *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure⁸ zu denken. Letztere dieser Möglichkeiten konnte durch nähere Untersuchung der Tautomerieverhältnisse der *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure (vergleiche die nachfolgende Mitteilung) ausgeschlossen werden; gegen die erste sprach eine Elektrotitration der Ätherextrakte. Wir haben daraufhin die Substanz isoliert: Elementaranalyse, Äquivalentgewicht, Dissoziationskonstanten, Schmelzpunkt und andere physikalische Eigenschaften weisen sie als *p*-Oxyphenylelessigsäure aus (Tabelle II).

Geringe Mengen von *p*-Oxyphenylelessigsäure sind seit deren Entdeckung durch E. UND H. SALKOWSKI bei der Fäulnis von Eiweiss^{9–11} wiederholt in normalen und pathologischen Harnen nachgewiesen worden^{4, 12}. Sie wurden bisher als Produkt bakterieller Eiweisszersetzung im Darmtraktus angesehen. Gegen eine solche Entstehung bei unseren Versuchen sprechen die rasche und grosse Ausscheidung, besonders aber, dass wir diese Substanz auch nach parenteraler Belastung mit *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure im Harn nachweisen konnten (Fig. 4). Wir schliessen aus unseren Versuchen, dass *p*-Oxyphenylelessigsäure unter die Reihe der Produkte des intermediären Stoffwechsels der *p*-Oxyphenylderivate zu rechnen ist.

Das Schema NEUBAUERS¹³ ist durch die Isotopen-Versuche amerikanischer Autoren^{13–15} heute wieder zur Grundlage unserer Anschauungen über den oxydativen Abbau des Tyrosins und Phenylalanins geworden. In diesem Schema nimmt *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure eine zentrale Stellung ein, und es erhebt sich die Frage, wie

deren Derivat, die *p*-Oxyphenylessigsäure, einzuordnen ist. In weiteren Ausscheidungs-experimenten haben wir versucht, uns über diese Frage zu orientieren. Nach den Entdeckungen der Arbeitskreise von SEALOCK¹⁶⁻¹⁸ und LEVINE¹⁹ über den Einfluss von Ascorbinsäure auf den Stoffwechsel der aromatischen Aminosäuren bei Meerschweinchen und menschlichen Frühgeburten und den Arbeiten von PAINTER UND ZILVA³⁹ sowie von LE MAY-KNOX UND KNOX⁴⁰ über die Wirkung von Ascorbinsäure auf den Tyrosinabbau durch Leberbrei hat es nahegelegen, unsere Belastungsversuche unter dem Einfluss von Ascorbinsäure zu wiederholen. Wir haben gefunden, dass die Ausscheidung des Essigsäurederivats nach Belastung mit *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure unter solchen Bedingungen zurückgeht (Fig. 5), während die Ausscheidungen nach Belastung mit *p*-Oxyphenylessigsäure selbst durch Ascorbinsäure unbeeinflussbar sind. Die Kontrollen dieser Versuche bestätigen alte Messungen von SCHOTTEN²⁰; sie zeigen, dass *p*-Oxyphenylessigsäure zu einem hohen Prozentsatz unverändert ausgeschieden wird.

Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass *p*-Oxyphenylessigsäure selbst kein Glied in der Kette des oxydativen Abbaus der *p*-Oxyphenylderivate ist, sondern durch eine Zweitreaktion entsteht. Dafür spricht auch, dass *p*-Oxyphenylessigsäure beim Alkaptonuriker kein Homogentisinsäure-Bildner ist.

Möglicherweise erfolgt der oxydative Abbau der *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure auf analogem Wege wie der Abbau der unsubstituierten Brenztraubensäure, bei dem Essigsäure selbst ebenfalls nicht das direkte Produkt oxydativer Decarboxylierung ist. Hier entsteht ein nahverwandter C₃-Körper, die "aktivierte Essigsäure"²¹⁻²⁵, welche sich zu Essigsäure verhält wie energiereiche und energiearme Bindung. Freie, "nicht aktivierte" Essigsäure ist also kein Glied in der Kette des oxydativen Abbaus; ihre Einschaltung erfordert die Mitwirkung energieliefernder Reaktionen²⁶⁻³⁰. Möglicherweise steht also *p*-Oxyphenylessigsäure zur Kette des oxydativen Abbaus der Oxyphenylderivate in ähnlicher Beziehung wie Essigsäure zum oxydativen Abbau der Kohlehydrate. Eine Klärung dieser Frage überschreitet die Leistungsfähigkeit des Ausscheidungsversuches.

Über die Verhältnisse beim Menschen, welche im Hinblick auf die Verwendung von *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure zur Prüfung der Leberfunktion³¹⁻³⁴ praktisch interessieren, wird der eine von uns (KIRBERGER) gesondert veröffentlichen, wenn genügend Versuchsmaterial vorliegt.

METHODEN

Kaninchen von 1.5 bis 2.5 kg wurden mit Steckrüben (400 g täglich) gefüttert, einer Kost, welche bei relativ grossen und konstanten Harnmengen (250-400 ml täglich) niedrige und relativ konstante Millon- und Penrose-Quastel-Leerwerte gewährleistet. Der stark alkalische Harn wurde jeweils sofort nach der Ausscheidung mit Schwefelsäure angesäuert und in 24-Stunden-Portionen von 8 bis 8 Uhr morgens gesammelt.

p-Oxyphenylbrenztraubensäure verdanken wir der Liebenswürdigkeit der Fa. Chemie-Werk Homburg A.-G. (Präparat Testacid). Die freie Säure wurde zur Applikation mit Natronlauge neutralisiert. Die Applikation per os geschah mit der Schlundsonde, die parenterale Applikation durch Injektion des umkristallisierten Präparats in die Ohrvene.

l-Tyrosin (Hoffmann la Roche) (α_D^{20} : gemessen 8.66, soll 8.64; N: gefunden 7.67%, berechnet 7.73%) wurde bei Fütterungsversuchen unter das geschnitzelte Futter gemischt.

Millon-Werte wurden nach dem Verfahren von FELIX UND TESKE³¹ am angesäuert ausgeätherten und nicht ausgeätherten Harn gemessen und anhand einer Eichkurve ausgewertet, welche mit *p*-Oxyphenylessigsäure angelegt worden war.

Ketosäure-Werte wurden in der Regel nach dem geringfügig modifizierten Verfahren³⁵ von PENROSE UND QUASTEL³⁶ gemessen (bezüglich des Eichstandards vergleiche den Anhang der nach-

folgenden Mitteilung). Bei einigen Versuchen wurde die spezifischere Methode von CREMER UND BERGER³⁷ angewandt, bei der das Dinitrophenylhydrazon der Ketosäure chromatographisch an Aluminiumoxyd gereinigt wird.

Zur Bestimmung nach PENROSE UND QUASTEL wurden 1 ml Harn mit 1 ml Dinitrophenylhydrazin-Reagenz (gesättigte Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in normaler HCl) gemischt. Nach 10 Minuten wurden 4 ml normale NaOH zugegeben und nach wenigen Minuten mit Wasser auf 30 ml aufgefüllt.

Extinktionen wurden mit dem Photometer Eppendorf gemessen, einem direkt anzeigenden photoelektrischen Kolorimeter, bei dem die Quecksilberlinien monochromatisch als Messtrahlung zur Verfügung stehen. Die Eichkurve für *p*-Oxyphenylelessigsäure ist in diesem Kolorimeter linear, ihre

Steigung beträgt bei einer Schichtdicke von 1 cm und für die Wellenlänge 546 m μ 0.197 ($\Delta l g \frac{i_0}{i}$

pro mg Substanz] (die Ablesung muss innerhalb der ersten 10 Minuten erfolgen). Die entsprechenden Werte für *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure und Tyrosin nach MILLON betragen 0.162 und 0.165, sie verhalten sich zu dem Wert für das Essigsäurederivat annähernd umgekehrt wie die Molgewichte. Die Eichkurve für *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure nach PENROSE UND QUASTEL ist ebenfalls linear, ihre

Steigung beträgt bei einer Schichtdicke von 0.5 cm und für die Wellenlänge 546 m μ 0.60 ($\Delta l g \frac{i_0}{i}$

pro mg Substanz] (vergleiche den Anhang der nachfolgenden Arbeit).

pH-Werte wurden mit der Glaselektrode nach McINNES UND DOLE gemessen; bei pH-Werten über pH 9 wurde die Elektrode mit Standard-Puffern geeicht.

PERORALE BELASTUNG MIT *p*-OXYPHENYLBRENTZTRAUBENSÄURE

In Fig. 1 sind die analytischen Daten von Belastungsversuchen an einem 1.6 kg schweren, gesunden, jungen Kaninchen mit steigenden Mengen *p*-Oxyphenylbrenz-

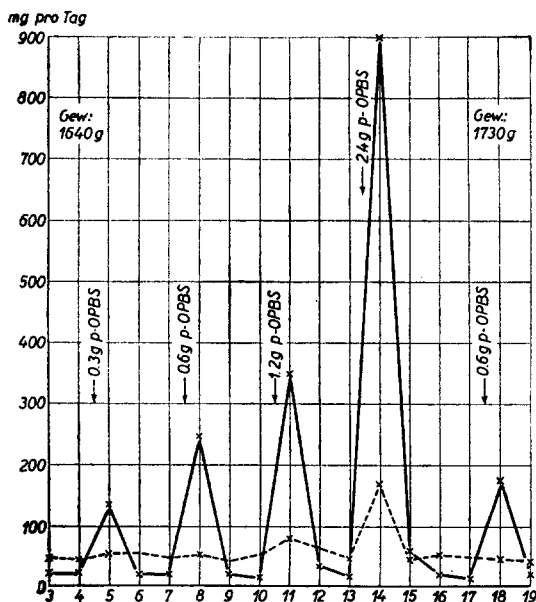


Fig. 1. Ausscheidungen im Harn nach peroraler Belastung mit *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure. Ausgezogene Kurve: ätherlösliche Millonwerte. Gestrichelte Kurve: Penrose-Quastel-Werte. Abszisse: Zeit in Tagen; Ordinate: Tagesausscheidung in mg *p*-Oxyphenylelessigsäure (gerade Kurve) beziehungsweise *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure (gestrichelte Kurve)

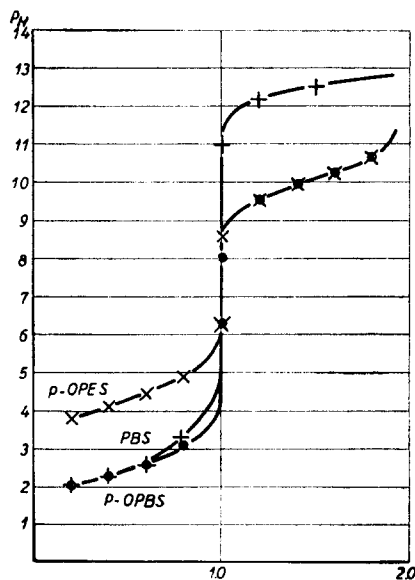


Fig. 2. Elektrotitrationskurven von M/20 *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure (Kreise), M/20 Phenylbrenztraubensäure (gerade Kreuze) und *p*-Oxyphenylelessigsäure (7.6 mg aus Harn isolierte Substanz pro ml) (schräge Kreuze). Abszisse: ml N/10 Natronlauge pro 2 ml Lösung

traubensäure eingetragen. Die Tiere wurden am ersten Versuchstag auf Steckrübenkost gesetzt. Vom dritten Tage an waren die Leerwerte konstant. Die ausgezogene Linie stellt die sogenannten ätherlöslichen Millonwerte (berechnet als *p*-Oxyphenylessigsäure), das heisst die Differenz der Millonwerte am ausgeätherten und nicht ausgeätherten Harn dar. Die gestrichelte Kurve zeigt die Penrose-Quastel-Werte (berechnet als *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure). Man erkennt, dass unveränderte Ausgangssubstanz erst bei sehr hohen Dosen in geringem Umfang ausgeschieden wird, während die Millonwerte beträchtlich erhöht sind. Der Quotient zwischen eingegebener und ausgeschiedener Substanzmenge sinkt im Verlaufe des 19 Tage währenden Versuches von 45% auf 32% (Tabelle I). Der Versuch wurde an 10 verschiedenen Kaninchen mit grundsätzlich gleichem Ergebnis wiederholt.

TABELLE I

Versuchstag	Eingenommen (<i>p</i> -Oxyphenylbrenz- traubensäure)	Ausgeschieden (Mole <i>p</i> -Oxyphenylessigsäure pro Mol <i>p</i> -Oxyphenyl- brenztraubensäure)
5.	0.3 g	0.44
8.	0.6 g	0.44
11.	1.2 g	0.28
14.	2.4 g	0.31
18.	0.6 g	0.32

PERORALE BELASTUNG MIT *L*-TYROSIN

Die analytischen Daten eines Belastungsversuches mit *L*-Tyrosin sind in Fig. 3 eingetragen. Etwa 1% der applizierten Mengen treten im Harn als *p*-Oxyphenylessigsäure auf. Die Ausscheidungen an Tyrosin und *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure liegen in der Grössenordnung der Leerwertschwankungen. Um die geringen Ausscheidungen der letzteren Substanz sicherer erkennen zu können, haben wir in diesem Versuch die Penrose-Quastel-Methode durch das spezifischere Verfahren von CREMER UND BERGER³⁷ ersetzt.

Wir fanden in keinem Versuch auch nur annähernd so hohe Ausscheidungen an *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure wie sie KOTAKE und seine Schüler^{6,7} unter ähnlichen Versuchsbedingungen nachgewiesen haben. Desgleichen sahen wir keinen Anhalt für das Auftreten von *p*-Oxyphenylmilchsäure.

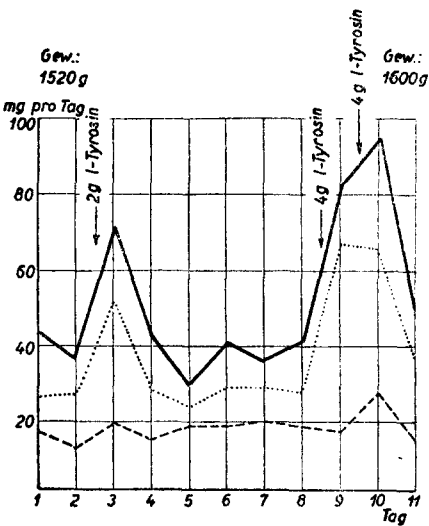


Fig. 3. Ausscheidungen im Harn nach peroraler Belastung mit *L*-Tyrosin Ausgezogene Kurve: Gesamt-Millon-Werte. Punktierte Kurve: Ätherlösliche Millon-Werte. Gestrichelte Kurve: *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure nach CREMER UND BERGER. Ordinate: Tagesausscheidungen in mg

ISOLIERUNG VON *p*-OXYPHENYLESSIGSÄURE

Als in α -Stellung unsubstituierte Carbonsäure besitzt *p*-Oxyphenylessigsäure eine relativ niedrige Dissoziationskonstante (Fig. 2). Wir haben uns diesen Umstand im Verlaufe der Isolierung dieser Säure zunutze gemacht und die Extrakte vor dem Ausäthern jeweils nur knapp unter das P_K angesäuert. Dadurch gelang die Abtrennung aller stärkeren Säuren wie zum Beispiel *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure und der Schwefelsäureester.

Je 1 g *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen an ein 2.5 kg schweres Kaninchen verfüttert. Der gesammelte Harn (720 mg Millon-Substanz) wurde im Vakuum eingengt. Der über Chlorcalcium getrocknete Rückstand (17.2 g) wurde dreimal mit je 50 ml Alkohol extrahiert, die Extrakte vereint und der Alkohol verjagt. Der Rückstand (3.8 g, 671 mg Millonsubstanz) wurde in 40 ml Wasser gelöst und nach Abzentrifugieren einer unlöslichen Schmiere 15 Minuten mit einer Spatelspitze Kohle geschüttelt. Nach der Filtration wurde auf p_H 3.5 angesäuert und dreimal mit 50 ml Äther extrahiert. Die Lösung wurde im Verlauf der ersten beiden Extraktionen jeweils alkalischer und vor der folgenden Extraktion erneut angesäuert. Die vereinigten Ätherauszüge wurden durch Schütteln mit Calciumchlorid getrocknet und der Äther verjagt. Es blieb eine kristalline Masse (580 mg Trockengewicht, 530 mg Millonsubstanz) zurück, die über Phosphorpentoxyd bei 60° und 1 mm Hg getrocknet und dreimal mit wasserfreiem Benzol ausgekocht wurde. Aus den Benzolextrakten kristallisierte über Nacht im Eisschrank die Substanz in leicht gelben Nadelchen welche ein zweites Mal aus Benzol umkristallisiert wurden. Die Kristallisation aus Benzol war mit Verlusten verbunden. Aus 720 mg im Harn ausgeschiedener Millonsubstanz wurden 362 mg umkristallisierten Produkts gewonnen; die Gesamtausbeute der Substanz betrug also 50.5%. Wir fanden keinen Anhalt für das Auftreten eines anderen *p*-Oxyphenylderivats ausser geringen Mengen *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure, insbesondere keine Oxyphenylmilchsäure.

TABELLE II
IDENTIFIKATION DER ISOLIERTEN *p*-OXYPHENYLESSIGSÄURE

Gemessene Werte	Soll
Fp. 148° (sublimiert unzersetzt)	Fp. 146°–148° (Sublimiert unzersetzt)
Äquivalentgewicht: 152 g/Mol (vergleiche Fig. 2)	152 g/Mol
Dissoziationskonstanten: $P_{K_1} = 4.28$ $P_{K_2} = 10.1$ ($M/20$ Lösung)	Essigsäure: P_K 4.62 Phenol: P_K 9.9
Elementaranalyse*: H: 5.30% C: 63.38%	H: 5.26% C: 63.16%

* Dr Ing. A. SCHOELLER, Kronach (Oberfranken)

PARENTERALE BELASTUNG MIT *p*-OXYPHENYLBRENTZTRAUBENSÄURE

Fig. 4 zeigt die analytischen Daten eines Versuches bei einem 1.7 kg schweren Kaninchen, bei dem 0.6 g *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure intravenös injiziert wurde. Der Versuch wurde durch zwei perorale Belastungen mit der gleichen Menge der gleichen Substanz eingeschlossen. Letztere zeigen das bereits oben erörterte Bild: Keine Ausscheidung der Muttersubstanz, Auftreten von *p*-Oxyphenylessigsäure im Betrage von 31 beziehungsweise 30% (Mol pro Mol) der applizierten Menge. Bei parenteraler Applikation dagegen finden wir neben 102 mg *p*-Oxyphenylessigsäure 122 mg unverändert ausgeschiedenen Ausgangsprodukts.

Nimmt man an, dass der Abbau der *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure sich in erster Linie in der Leber vollzieht, während dieselbe Substanz von den Nieren unverändert ausgeschieden wird, dann ist dieses Ergebnis verständlich, denn bei parenteraler Applikation erreicht ein Teil der Substanz die Niere, ehe er die Leber durchströmen kann. Zieht man dieser Überlegung entsprechend den unverändert ausgeschiedenen Teil von der applizierten Menge ab, dann beträgt die Umwandlung in *p*-Oxyphenylessigsäure 25.3%. Sie liegt also in der gleichen Grössenordnung wie bei peroraler Belastung, und man darf aus dem Experiment schliessen, dass *p*-Oxyphenylessigsäure ein Produkt des Intermediärstoffwechsels und nicht der bakteriellen Zersetzung im Verdauungstraktus ist.

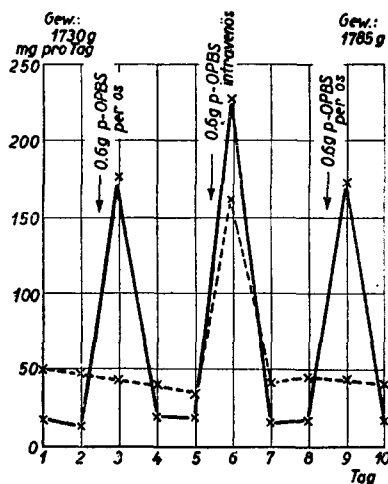


Fig. 4

BELASTUNGEN MIT *p*-OXYPHENYLBRENTZTRAUBENSÄURE UND *p*-OXYPHENYLESSIGSÄURE UNTER EINFLUSS VON ASCORBINSÄURE

Fig. 5 zeigt die analytischen Daten einer Reihe peroraler Belastungen bei einem 2.3 kg schweren Kaninchen mit *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure und *p*-Oxyphenylessigsäure vor und unter gleichzeitiger Verabreichung von *L*-Ascorbinsäure.

Die Ergebnisse des Versuches lassen sich folgendermassen ordnen:

1. Die Ausscheidungen nach Belastung mit *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure betragen unter Normalbedingungen in Übereinstimmung mit den bereits oben mitgeteilten Versuchen 40% und 36% (Mol pro Mol) der eingegebenen Menge. Diese Ausscheidung vermindert sich bei einer täglichen Dosis von 500 mg Ascorbinsäure auf 13 und 10%.
2. Die Ausscheidung nach Belastung mit *p*-Oxyphenylessigsäure beträgt 64%. Sie bleibt im Gegensatz zur Ausscheidung nach Belastung mit *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure unter der Einwirkung von täglich 500 mg Ascorbinsäure unbeeinflusst und beträgt 67%.

Ähnliche Belastungsversuche mit *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure wie der oben geschilderte wurden von SEALOCK und Mitarbeitern¹⁷ an Meerschweinchen durchgeführt. Sie fanden grössere Ausscheidungen einer nicht näher definierten "tyrosine-like

compound", welche möglicherweise *p*-Oxyphenylessigsäure ist. Allerdings wurde die Ausscheidung dieser Substanz durch Ascorbinsäure nicht beeinflusst.

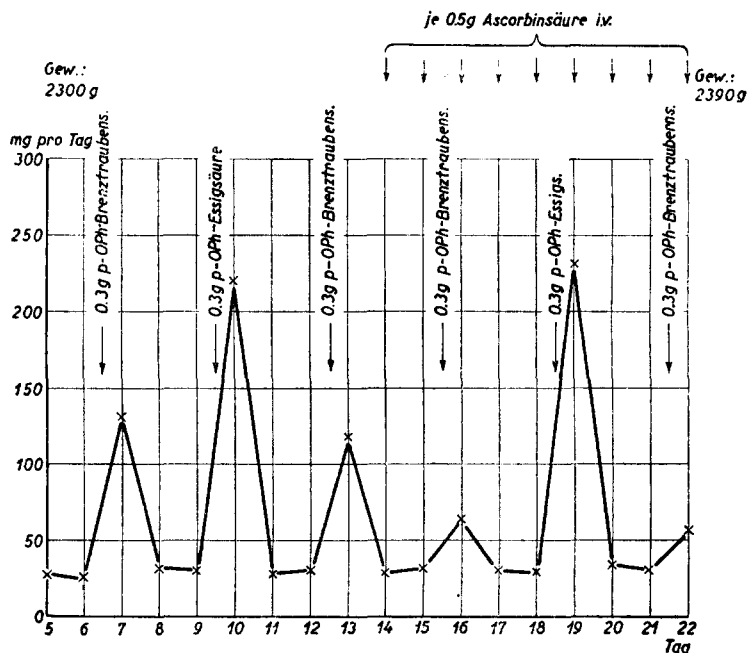


Fig. 5

ZUSAMMENFASSUNG

Im Harn von Kaninchen, welche mit *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure belastet wurden, konnte *p*-Oxyphenylessigsäure im Betrage bis zu 40% des Ausgangsproduktes nachgewiesen und durch Isolierung der Substanz identifiziert werden. Es wurde gezeigt, dass diese Substanz Umsetzungen des Intermediärstoffwechsels entstammt. Im Anschluss an Belastungsversuche unter dem Einfluss von Ascorbinsäure wird die Stellung der *p*-Oxyphenylessigsäure zur Kette des oxydativen Abbaus aromatischer Substanzen diskutiert.

SUMMARY

In urine of rabbits administered *p*-hydroxyphenylpyruvic acid, 40% of this compound could be recovered in the form of *p*-hydroxyphenylacetic acid. Its chemical nature was established after isolation of the substance. It has been proved to originate from reactions taking place in intermediary metabolism. In connection with tests in which *p*-hydroxyphenylpyruvic acid was administered together with ascorbic acid the place of *p*-hydroxyphenylacetic acid in the process of oxydative breakdown of aromatic compounds is discussed.

RÉSUMÉ

Le 40% de la quantité d'acide *p*-hydroxyphénylpyruvique administrée à des lapins a pu être récupéré sous forme d'acide *p*-hydroxyphénylacétique à partir de l'urine de ces animaux. Nous avons montré que l'acide *p*-hydroxyphénylacétique prend naissance au cours de réactions du métabolisme intermédiaire. A la suite d'essais au cours desquels l'acide *p*-hydroxyphénylpyruvique fut administré avec de l'acide ascorbique, nous avons discuté la place occupée par l'acide *p*-hydroxyphénylacétique vis à vis de la chaîne de réactions de la dégradation oxydative des substances aromatiques.

LITERATUR

- ¹ E. KIRBERGER, *Angew. Chem.*, 61 (1949) 254.
- ² O. SCHULTZE UND L. RIESS, *Über akute Phosphorvergiftung und Leberatrophy*, Berlin 1869, besonders S. 369.
- ³ E. BAUMANN, *Z. physiol. Chem.*, 6 (1882) 192.
- ⁴ H. BLENDERMANN, *Z. physiol. Chem.*, 6 (1882) 234.
- ⁵ Y. KOTAKE UND Z. MATSUOKA, *Z. physiol. Chem.*, 89 (1914) 475.
- ⁶ Y. KOTAKE, Z. MATSUOKA UND M. OKAGAWA, *Z. physiol. Chem.*, 122 (1922) 166.
- ⁷ Y. KOTAKE UND M. OKAGAWA, *Z. physiol. Chem.*, 122 (1922) 201.
- ⁸ G. MEDES, *Biochem. J.*, 26 (1932) 922; vergleiche auch H. A. PAINTER UND S. S. ZILVA, *Biochem. J.*, 41 (1947) 520.
- ⁹ E. SALKOWSKI UND H. SALKOWSKI, *Ber.*, 12 (1879) 653.
- ¹⁰ E. BAUMANN, *Ber.*, 12 (1879) 1450; 13 (1880) 279.
- ¹¹ E. SALKOWSKI UND H. SALKOWSKI, *Z. physiol. Chem.*, 7 (1882) 161.
- ¹² E. BAUMANN, *Z. physiol. Chem.*, 4 (1880) 304; 6 (1882) 183; 10 (1885) 123.
- ¹³ T. WINNICK, F. FRIEDBERG UND D. M. GREENBERG, *J. Biol. Chem.*, 173 (1948) 189.
S. WEINHOUSE UND R. H. MILLINGTON, *J. Biol. Chem.*, 175 (1948) 995.
- ¹⁴ B. SCHEPARTZ UND S. GURIN, *Federation Proc.*, 8 (1949) 248.
- ¹⁵ A. B. LERNER, *J. Biol. Chem.*, 181 (1949) 281.
- ¹⁶ R. R. SEALOCK UND H. E. SILBERSTEIN, *J. Biol. Chem.*, 135 (1940) 251.
- ¹⁷ R. R. SEALOCK, J. D. PERKINSON JR. UND D. H. BASINSKI, *J. Biol. Chem.*, 140 (1941) 153.
- ¹⁸ R. R. SEALOCK, M. GLADSTON UND J. M. STEELE, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 44 (1940) 580.
- ¹⁹ S. Z. LEVINE, E. MARPLES UND H. H. GORDON, *Science*, 90 (1939) 620.
S. Z. LEVINE, *Harvey Lectures, Ser.*, 42 (1946/47) 303.
- ²⁰ C. SCHOTTEN, *Z. physiol. Chem.*, 7 (1882) 23.
- ²¹ F. LIPMANN, *Advances in Enzymol.*, 6 (1946) 231.
- ²² H. G. WOOD, *Physiol. Revs.* 26 (1946) 198.
- ²³ C. MARTIUS UND F. LYNEN, *Advances in Enzymol.*, 10 (1950) 167.
- ²⁴ J. R. STERN UND S. OCHOA, *J. Biol. Chem.*, 179 (1949) 491.
- ²⁵ S. KORKES, J. R. STERN, I. C. GUNSALUS UND S. OCHOA, *Nature*, 166 (1950) 439.
- ²⁶ NACHMANSOHN UND MACHADO, *J. Neurophysiol.*, 6 (1943) 397.
- ²⁷ G. D. NOVELLI UND F. LIPMANN, *J. Biol. Chem.*, 171 (1947) 833.
- ²⁸ N. O. KAPLAN UND F. LIPMANN, *J. Biol. Chem.*, 174 (1948) 37.
- ²⁹ M. SOODAK UND F. LIPMANN, *J. Biol. Chem.*, 175 (1948) 999.
- ³⁰ F. LYNEN, *Angew. Chem.*, 63 (1951) 47.
- ³¹ K. FELIX UND R. TESKE, *Z. physiol. Chem.*, 267 (1941) 173.
- ³² K. FELIX, *Z. physiol. Chem.*, 281 (1944) 36.
- ³³ R. EMMRICH, *Z. ges. exptl. Med.*, 109 (1941) 604.
- ³⁴ R. EMMRICH, *Z. ges. exptl. Med.*, 110 (1942) 667.
- ³⁵ E. KIRBERGER, *Klin. Wochschr.*, 27 (1949) 48.
- ³⁶ L. PENROSE UND J. H. QUASTEL, *Biochem. J.*, 31 (1937) 266.
- ³⁷ H. D. CREMER UND H. BERGER, *Klin. Wochschr.*, 25 (1947) 222.
- ³⁸ O. NEUBAUER, *Deut. Arch. klin. Med.*, 95 (1909) 211.
- ³⁹ H. A. PAINTER UND S. S. ZILVA, *Biochem. J.*, 46 (1950) 542.
- ⁴⁰ M. LE MAY-KNOX UND W. E. KNOX, *Biochem. J.*, 48 (1951) XXII.

Eingegangen den 26. April 1951