

# Das Verhalten von $\alpha$ -Aminosäuren und $\alpha$ -Ketonsäuren im Tierkörper.

Von

F. Knoop und stud. med. Ernst Kertess.

(Aus der medizinischen Abteilung des chemischen Laboratoriums in Freiburg i. B.)

(Der Redaktion zugegangen am 1. März 1911.)

Nachdem bereits in einer vorläufigen Mitteilung<sup>1)</sup> die Ergebnisse der Verfütterung  $\alpha$ -substituierter  $\gamma$ -Phenylbuttersäuren veröffentlicht waren, soweit sie besonders die Bildung einer Aminosäure aus einer stickstofffreien Säure, sowie deren Acetylierung betrafen, veröffentlichen wir hiermit die Ergebnisse in extenso unter Beifügung weiterer Befunde und einiger Versuche, die sich daran anschlossen. Vorher sei jedoch darauf hingewiesen, daß die von Knoop entwickelten Vorstellungen über die Fähigkeit des Organismus, Aminosäuren auf synthetischem Wege zu bilden, inzwischen Embden und Schmitz<sup>2)</sup> veranlaßt haben, auf dem Wege der Durchblutung nach der Bildung der entsprechenden physiologischen Aminosäuren zu suchen, deren Nachweis durch Fütterungsversuche am Gesamttier nicht erwartet werden kann. In einer vorläufigen Mitteilung geben sie an, daß ihnen dieser Nachweis bei Phenylalanin, Tyrosin und Alanin gelungen sei, die aus den Ammonsalzen der zugehörigen Ketonsäuren gebildet sind. Alanin wurde entsprechend den Deduktionen von Knoop<sup>3)</sup> auch aus dem Kohlenhydrat glykogenhaltiger Lebern gebildet, während glykogenfreie Lebern diesen Befund nicht gaben. Dieser synthetischen Aminosäurebildung kommt demnach eine weitergehende Bedeutung zu.

<sup>1)</sup> Knoop, Diese Zeitschrift, Bd. LXVII, S. 489 (1910).

<sup>2)</sup> Embden und Schmitz, Biochem. Zeitschrift, Bd. XXIX, S. 423 (1910).

<sup>3)</sup> a. a. O. S. 500.

I. Verfütterung der  $\gamma$ -Phenyl- $\alpha$ -aminobuttersäure.

$\gamma$ -Phenyl- $\alpha$ -Amidobuttersäure  $C_6H_5 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2)COOH$  wurde aus Zimmtaldehydcyanhydrin über die  $\alpha$ -Ketonsäure nach der Methode von Knoop und Hoessli<sup>1)</sup> dargestellt, die nach Angabe von E. Fischer und Schmitz<sup>2)</sup> bequemer zum Ziele führt, als der von letzteren eingeschlagene Weg mittels der Malonsäuresynthese. Die Reduktion des Oxims der Phenylketobuttersäure wurde entweder mit Natriumamalgam in wässriger Lösung im  $CO_2$ -Strom oder in Alkohol bei essigsaurer Reaktion oder in 20%iger Essigsäure mit Zinkstaub vorgenommen; Aluminiumamalgam liefert zwar bisweilen bessere, jedoch sehr schwankende Ausbeuten.

Ein Hund von ca. 15 kg erhielt bei gemischter Fleisch-Brotkost im Verlaufe von 3 Tagen 7 + 7 + 4 g Phenylamidobuttersäure zwischen sein Futter gerührt, das er anstandslos fraß, da die reine Säure geschmacklos ist. Der Harn von 5 Tagen wurde aufgefangen. Aus der Gesamtmenge von 2710 ccm konnten 4 verschiedene Substanzen krystallinisch isoliert werden, die sicher dem verfütterten Material entstammten. Zunächst krystallisierten aus der Portion des 2. Tages beim Stehen spontan 0,3 g einer Substanz, die in heißem Wasser schwer, in Säure und Alkali leicht löslich war und die Eigenschaften der verfütterten Säure zeigte (A). Sie wurde gemeinschaftlich mit der zweiten Krystallisation verarbeitet. Die Gesamtmenge des Harns wurde im Vakuum eingengt, dabei schieden sich von neuem 2,3 g Krystalle ab, die größtenteils aus Aminosäure bestanden, vermisch mit kleinen Mengen von Na- und Ca-Salzen anderer Säuren. Beide konnten leicht getrennt werden durch Zusatz von Normalsäure, die die Aminosäure löste, die anderen Säuren dagegen frei machte und abschied. Sie wurden abfiltriert und erwiesen sich als Harnsäure und Kynurensäure. Die Aminosäure krystallisierte nach Zusatz von Normallauge aus. Sie zeigte nach zweimaligem Umkrystallisieren alle Eigenschaften der verfütterten Säure, nur der Zersetzungspunkt lag bei ca.  $305^\circ$ , etwa  $10^\circ$  höher, je nach der Geschwindigkeit des Erhitzens schwankend und

<sup>1)</sup> Knoop und Hoessli, Berichte, Bd. XXXIX, S. 1477 (1906).

<sup>2)</sup> E. Fischer und Schmitz, Berichte, Bd. XXXIX, S. 2208 (1906).

deshalb nicht eben charakteristisch. Beim Vermischen mit der verfütterten Säure wurde deren Zersetzungspunkt nicht herabgedrückt. Daraufhin wurde die spezifische Drehung bestimmt, auch aktives Phenylalanin schmilzt höher als der Racemkörper. In der Tat zeigte der Körper Linksdrehung.

0,305 g wurden in 6,8 ccm 20%iger HCl gelöst und zeigten im Dezimeterrohr eine Drehung von  $\alpha = - 1,33^\circ$

Darnach  $[\alpha]_D = - 29,55$ .

Es lag die l-Modifikation vor, wie sich nachher zeigen wird, fast frei von der d-Säure, der Organismus kann also die eine Hälfte, hier die linksdrehende Form schwerer angreifen, als die andere.

Der eingeengte Harn wurde mit Phosphorsäure versetzt und im Schacherlapparat tagelang mit Äther extrahiert. Schon während der Extraktion schieden sich lange Nadeln aus dem Äther ab. Der Äther wurde verdampft, die hierbei stark vermehrten Nadeln abgesogen und mit kaltem Wasser gewaschen. Das Filtrat wurde mit Wasserdampf destilliert (das Destillat gab keine Jodoformreaktion), mit Tierkohle entfärbt und langsam eingeeengt. Bei vorsichtiger fraktionierter Krystallisation schieden sich anfangs mehrere Fraktionen ab, die nach Schmelzpunkt ( $178^\circ$ ) und Krystallform ausschließlich aus obigen Nadeln bestanden (B), dann eine Fraktion vom Schmelzpunkt  $188^\circ$ , die reine Hippursäure war (C), dann Gemische beider, die vereinigt und von neuem fraktioniert krystallisiert wurden. Zuletzt hinterblieb ein Sirup, der auf keine Weise mehr spontan krystallisierte. Er wurde getrocknet und mit wenig Äther ausgezogen. Was nicht gleich in den Äther ging, ließ sich jetzt aus Wasser fast ganz zu den zwei gefundenen Säuren aufarbeiten. Der Ätherrückstand krystallisierte aus heißem Benzol beim Abkühlen in Form schöner farbloser Nadeln (D). Die geringen Reste, die nicht krystallisierten, weniger als 0,5 g, gaben deutlich die Claisensche Reaktion mit thiophenhaltigem Benzol und  $H_2SO_4$  auf  $\alpha$ -Ketonsäuren.

Die zuerst gefundene Säure (B) zeigte ein außerordentliches Krystallisationsvermögen, aus heißem Wasser ließ sie sich bei vorsichtigem Abkühlen in Nadeln bis zu 10 cm Länge

gewinnen, bei plötzlicher Ausscheidung erscheint sie in Blättchen. Im ganzen wurden 4,3 g erhalten, die bei  $178^\circ$  scharf schmolzen und N enthielten.

0,1861 g Substanz: 0,4464 g  $\text{CO}_2$  und 0,1186 g  $\text{H}_2\text{O}$ .  
0,2044 g Subst. verbrauchten nach Kjeldahl 9,5 ccm  $n/_{10}$ -Säure.

$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_3\text{N}$ : Berechnet C 65,12% H 6,84% N 6,35%  
Gefunden 65,39% 7,03% 6,50%.

Die Substanz enthält kein Krystallwasser, reagiert sauer, löst sich schwer in kaltem Wasser, besser in Äther und heißem Wasser, leicht in Alkohol, sowie in Alkalien, schwer in Chloroform, sehr schwer in heißem Benzol. Sie ist optisch aktiv und dreht rechts. 0,624 g in 13,6 ccm Normal-Natronlauge gelöst drehen im 2 dm-Rohr  $+ 1,783^\circ$ .

$$[\alpha]_D = + 19,45.$$

Eine weitere Bestimmung mit der doppelten Menge ergab  $[\alpha]_D + 20,06$ .

Nach der Zusammensetzung konnte der gefundene Körper ein Acetylprodukt der verfütterten Aminosäure sein. Um diese Frage zu entscheiden, wurden 1,32 g Substanz mit Phosphorsäure destilliert, das Destillat mit Silberoxyd erwärmt. Aus dem eingengten Filtrat schieden sich die charakteristischen Nadeln des Silberacetates ab.

0,2232 g Substanz: 0,1438 g Ag.

$\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Ag}$ : Berechnet Ag: 64,65%. Gefunden 64,43%.

Aus dem Destillationsrückstand krystallisierten auch vor der Neutralisation der Phosphorsäure erhebliche Mengen von Blättchen, die das Aussehen der Phenylaminobuttersäure hatten. Sie verhielten sich in allen Eigenschaften wie diese, nur drehten sie, wie das Acetylprodukt, rechts.

0,8182 g in 30 ccm 20%iger HCl drehten im 2 dm-Rohr  $+ 1,8$ .

$$[\alpha]_D = + 32,99.$$

Diese Rechtsdrehung ist etwas stärker, als die Linksdrehung der direkt aus dem Harn gewonnenen Säure. Da die synthetische Säure bisher nicht gespalten wurde, so kann über die Einheitlichkeit der beiden Stereoisomeren nichts Definitives gesagt werden. Doch entsprechen die Werte der beiden gefundenen Stereoisomeren einander annähernd, so daß vermut-

lich die reine Form hier vorliegt. Über die Frage, ob diese Verbindung nicht über die Ketonsäure entsteht, wird später zu sprechen sein.

Aus dem Tatsachenmaterial ergibt sich, daß aus 18 g Phenylaminobuttersäure 4,3 g Acetylprodukt gebildet war. Die gewonnene Hippursäure wurde nur durch Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt und Benzoesäurebildung beim Kochen mit HCl identifiziert. Es wurden 0,98 g reine Säure erhalten.

Die vierte Substanz (D) krystallisierte in einer Menge von 1,2 g aus Benzol in schönen sternförmig angeordneten Nadeln, die nach einmaligem Umkrystallisieren scharf bei 114° schmolzen. Sie war N-frei und gab folgende Analysenzahlen:

0,2030 g Substanz: 0,4980 g CO<sub>2</sub> 0,1300 g H<sub>2</sub>O

C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>: Berechnet C 66,63% H 6,72%

Gefunden 66,89% 7,09%.

Sie gab keine Millonsche Reaktion — es kam also nur Hydroxyl in der Seitenkette in Betracht, und hier war nach den Beobachtungen von Neubauer<sup>1)</sup> über Mandelsäurebildung bei Verfütterung von Phenylamidoessigsäure an die Bildung von Phenyl- $\alpha$ -oxybuttersäure zu denken. Die Phenyl- $\alpha$ -oxybuttersäure ist von Fittig dargestellt und hat den Schmelzpunkt 104,5°. Ein Vergleich der synthetischen Säure mit unserem Produkt gab viel Ähnlichkeiten: Die Krystallisation aus heißem Benzol verläuft bei beiden ganz gleich, beide Körper sublimieren bei vorsichtigem Erwärmen auf der elektrischen Heizplatte in gleicher Weise. Die Differenz im Schmelzpunkt konnte auf optischer Aktivität beruhen, da auch Neubauers Oxy-säure aktiv war und die Reduktion vermutlich asymmetrisch verlaufen war. In der Tat zeigte die Säure aus dem Harn Rechtsdrehung: 0,485 g in 14,0 ccm  $n/5$ -Natronlauge gelöst drehten im 2 dm-Rohr + 0,9°. Darnach  $[\alpha]_D = + 12,94$ .

Da auch die aktive Mandelsäure und die aktive p-Oxyphenylmilchsäure 15 bzw. 20° höher, als die entsprechenden Racemkörper schmelzen, so konnte der höhere Schmelzpunkt die Annahme, daß hier die d- $\gamma$ -Phenyl- $\alpha$ -oxybuttersäure vorlag, nur stützen. Wir haben deshalb die aktive Säure mit

<sup>1)</sup> Neubauer, Habilitationsschrift, München 1908.

Bleioxyd bei 160—170° im Rohr racemisiert. Das Reaktionsprodukt zeigte sofort den Schmelzpunkt 104,5°, der sich auch bei mehrfachem Umkrystallisieren aus Benzol nicht änderte. Es liegt also die *d*- $\gamma$ -Phenyl- $\alpha$ -oxybuttersäure vor und damit ist ein weiterer Fall gefunden, in dem im Tierkörper aus einer inaktiven  $\alpha$ -Aminosäure eine aktive Oxysäure gebildet wird. Da hier die betreffende Reaktion in einer fetten Seitenkette vor sich gegangen ist, in der das in Frage kommende C-Atom viel weniger unter dem Einfluß der Kernbenachbarung steht, wie bei der Phenylamidoessigsäure Neubauers, so kann von diesem Fall aus eine Übertragung der gemachten Befunde auf die aliphatische Reihe mit vollem Rechte vorgenommen werden,<sup>1)</sup> um so mehr, als sich auch die Übertragung der von Knoop gemachten Befunde über den Abbau der Phenylbuttersäure und ihrer Homologen auf die aliphatischen Fettsäuren in vollem Umfange als berechtigt erwiesen hat. Für die nächst niedere Säure, das Phenylalanin, bestehen ja allerdings zweifellos Beziehungen zwischen der  $-\text{CH}(\text{NH}_2)$ -Gruppe und dem Kern, welche sich in der Zerstörbarkeit des Benzolkernes dokumentieren, die nach den Befunden von Knoop<sup>2)</sup> nur bei den Seitenketten Alanin, Brenztraubensäure und Milchsäure leicht vor sich geht. In unserem Falle ließen sich mehr als 40% der verfütterten Substanz wiederfinden, wobei die Frage, ob alles Material resorbiert worden ist, nicht geprüft wurde.

Der Kernzerstörbarkeit am Normalen entspricht nach Neubauer und Falta die Homogentisinsäurebildung am Alkaptonuriker. K. Fromherz<sup>3)</sup> hat im hiesigen Laboratorium feststellen können, daß Phenylamidobuttersäure bei diesem kein Alkapton bildet. Aus dem Alkaptonharn sowie aus dem eines Selbstversuches, den Fromherz vornahm, ließ sich vielmehr die gleiche Substanz gewinnen, die sich nachher als Acetylamino-säure erwies. Die Seitenkette einer Aminobuttersäure verleiht

<sup>1)</sup> Neubauer selbst lehnte eine Verallgemeinerung seines Befundes eben wegen der Kürze der Seitenkette seiner Phenylaminoessigsäure vorerst ab. Habilitationsschrift S. 33.

<sup>2)</sup> Knoop, Habilitationsschrift, Freiburg 1904, Speyer u. Kaerner.

<sup>3)</sup> Fromherz, Dissertation, Freiburg 1908.

demnach der Gesamtverbindung in dieser Richtung ganz andere Eigenschaften, als die eines Alanins. Wenn an einen besonderen Einfluß der  $-CHNH_2$ -Gruppe auf die physiologische Verarbeitung bei dem vorliegenden Benzylalanin zu denken war, so konnte man mit der Bildung von Chinolinderivaten rechnen. Die Gewinnung von Kynurensäure direkt aus der ersten Krystallisation des eingeeengten, nicht angesäuerten Harnes bot zu derartigen Überlegungen Stoff, da eine solche Gewinnung nirgends beschrieben scheint. Aber ein einfacher Ringschluß zwischen Aminogruppe und Ortho-Kohlenstoffatom hätte zu einer  $\alpha$ -Chinolin-carbonsäure führen müssen, Kynurensäure ist dagegen eine  $\beta$ -Carbonsäure. Einfache Beziehungen sind deshalb ausgeschlossen, der angegebene Befund bedarf weiterer Verfolgung.

Von den verfütterten 18 g Phenylamidobuttersäure waren demnach über 2 g als aktive l-Form unverändert, 4,3 g entsprechend ca. 3,6 g der d-Aminosäure als Acetylverbindung, 1,2 g als Oxysäure und ca. 1 g als Hippursäure wiedergefunden. Abgesehen von den rund 56%, die verschwanden, zum Teil vielleicht nicht resorbiert wurden, ist die größte Menge (20%) der Acetylierung verfallen, ein Teil (11%) unverändert ausgeschieden, mehr als 12% zur  $\alpha$ -Ketonsäure oxydiert worden, von denen 6,5% zur Oxysäure reduziert, 5,5% weiter zu Benzoesäure abgebaut wurden. Die reduktive Bildung der Oxysäure ergibt sich aus weiter zu besprechenden Befunden — die Hippursäurebildung spricht dafür, daß die  $\alpha$ -Aminosäure über die Ketonsäure zu der nächst niederen Fettsäure, hier der Phenylpropionsäure, abgebaut wurde, die ja Hippursäure liefert. Phenacetursäure wurde nicht gefunden.

### I. Verfütterung der Ketonsäure.

Die Gesichtspunkte, die uns zu der Verfütterung der  $\alpha$ -Ketonsäure geführt haben, sind bereits in der vorläufigen Mitteilung erörtert worden. Die Frage nach der Reversibilität der ersten Phase im oxydativen Abbau und damit der Synthese einer Aminosäure im Tierkörper ließ sich nach den obigen Befunden hier mit einiger Aussicht auf Erfolg angreifen, da etwa gebildete Phenylaminobuttersäure gegenüber anderen Aminosäuren schwer angreifbar und als Acetylprodukt eventuell leicht zu isolieren

sein würde. Die Ketonsäure wurde nach Fittig gewonnen — ihre Konstitution ist durch Knoop und Hoessli sichergestellt, die sie mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Phenylpropionsäure überführen konnten. Per os verfüttert, rief die Säure wiederholt Erbrechen hervor, deshalb wurde sie nach mancherlei verlustreichen Versuchen als Natriumsalz subcutan gegeben.<sup>1)</sup> Isoliert wurden hier qualitativ die gleichen Produkte, wie bei der Aminosäure, nämlich die Oxysäure, Hippursäure und die Acetylaminosäure. Der Versuch wurde dreimal gemacht, einmal 6 Tage, einmal 4 Wochen nach der Verfütterung von Aminosäure und einmal an einem Hund, der nie die Aminosäure erhalten hatte. Die Art der Isolierung der Ausscheidungsprodukte bot hier nichts Neues. Folgender Versuch sei näher beschrieben:

14 g Ketonsäure ( $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3 + 1\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ ) wurden im Laufe von 2 Tagen als Natriumsalz injiziert, davon gingen durch Zerfall einer Injektionsstelle vielleicht 2 g verloren, so daß etwa 10 g wasserfreier Säure resorbiert wurden. Der Harn wurde genau wie oben verarbeitet. Aus dem eingeeengten Ätherextrakt krystallisierten in vorsichtig getrennten Fraktionen direkt erhebliche Mengen von  $\alpha$ -Oxysäure neben Hippursäure und einer kleinen Menge Acetylaminosäure. Die Oxysäure konnte von den anderen Krystallen durch warmes Benzol leicht getrennt werden, ebenso gab auch hier der sirupöse Rückstand noch an Benzol Oxysäure ab. Nach wochenlangem Stehen krystallisierten noch zweimal kleine Mengen von Acetylaminosäure aus, dann blieb ein Rest von ca. 1 g, der die Claisensche Reaktion gab und zwar deutlicher als der des Aminosäureharns, aber in Äther gelöst und mit einer Bisulfidlösung geschüttelt nur unsicher unveränderte Ketonsäure nachweisen ließ.

Gewonnen wurden in diesem Versuche als Hauptprodukt 2,46 g Phenyl- $\alpha$ -oxybuttersäure vom Schmelzpunkt  $114^\circ$ , 1,28 g Hippursäure und insgesamt 0,44 g Acetylaminosäure vom Schmelzpunkt  $178^\circ$ . Die Oxysäure verhielt sich in allem wie das gleiche

<sup>1)</sup> Von einer Verwendung der Ammonsalze, die Embden und Schmitz benutzt haben, wurde mit Rücksicht auf die unten erwähnte starke Reaktionsfähigkeit der  $\alpha$ -Ketonsäuren mit Ammoniak Abstand genommen. Vgl. de Jong: Recueil des Travaux, Bd. XIX, S. 259 (1900).

Produkt aus der Aminosäure, ein Mischschmelzpunkt beider zeigte keine Depression. Mit den jetzt gewonnenen reichlichen Mengen wurde der Nachweis, daß die  $\alpha$ -Oxysäure vorlag, noch durch einen Oxydationsversuch vervollständigt. Am geeignetsten erwies sich  $\text{KMnO}_4$ , so berechnet, daß es nur bis  $\text{MnO}_2$  reduziert werden und 2 Moleküle  $\text{KMnO}_4$  nur 3 Atome O abgeben sollten. Der gleiche Weg hatte bei der Oxydation des Oxydesaminohistidins gute Dienste geleistet. So wurden 0,5 g Substanz in warmem Wasser gelöst und mit der ganzen Menge einer schwefelsauren Lösung von 0,6 g  $\text{KMnO}_4$  in einer Portion versetzt, vom Braunstein heiß abfiltriert und zur Krystallisation in den Eisschrank gestellt. Es krystallisierten 0,1 g einer Säure, die nach einmaligem Umkrystallisieren scharf bei  $48,5^\circ$  schmolzen und mit synthetischer Hydrozimmtsäure verrieben den gleichen Schmelzpunkt behielten.

Die hier erhaltene Oxysäure zeigte dieselbe Rechtsdrehung wie die Säure aus der Aminosäure. 0,450 g in 14 ccm  $\frac{1}{5}$ -Normallauge gelöst drehten im 2 dm-Rohr im Mittel  $+\ 0^\circ 50'$

$$[\alpha]_D = + 12,99.$$

Die Tatsache, daß Keton- und Aminosäure die gleiche  $\alpha$ -Oxysäure lieferten, legt den Gedanken nahe, daß die Oxysäure bei der Aminosäure ebenso wie bei der Phenylaminoessigsäure Neubauers über die Ketonsäure entstanden ist. Dafür spricht auch die erheblich größere Menge, die aus der Ketonsäure gewonnen wurde: 2,46 g aus ca. 10 g Ketonsäure neben 1,2 g aus 18 g Aminosäure. Ein direkter physiologischer Ersatz der Aminogruppe durch Hydroxyl liegt offenbar auch hier nicht vor, sondern Oxydation und Reduktion nebeneinander haben die Bildung dieses Produktes veranlaßt. Wir werden uns gleich mit der Frage zu befassen haben, ob nicht auch für die Acetylierung der Aminosäure intermediäre Oxydations- und Reduktionsprozesse anzunehmen sind.

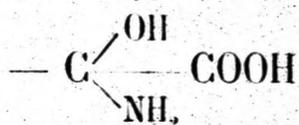
Bei der Ketonsäureverfütterung wurden 0,44 g der un-  
gemein charakteristischen Acetylaminobuttersäure gewonnen. Die Substanz schmolz scharf bei  $178^\circ$ , zeigte das gleiche enorme Krystallisierungsvermögen, die gleichen Löslichkeitsverhältnisse wie die oben beschriebene Säure und behielt mit

dieser verrieben scharf den gleichen Mischschmelzpunkt. Eine Spaltung von 0,3 g mit Phosphorsäure führte zu der gleichen Aminosäure, die Essigsäure konnte nur am Geruch erkannt werden. Es war die gleiche d-Modifikation wie bei der Aminosäure gebildet. 0,386 g in 13,6 cem Normallauge drehten im 2 dm-Rohr im Mittel  $+\ 1^{\circ}\ 18'$ . Darnach

$$[\alpha]_D = +\ 22,9.$$

Wir haben es demgemäß mit der gleichen Phenylacetylaminobuttersäure zu tun, die nach der Verfütterung der Aminosäure erhalten wurde.<sup>1)</sup> Die Bedeutung dieses Nachweises, daß der Tierkörper Aminosäuren synthetisch bilden kann, ist schon in der vorläufigen Mitteilung besprochen worden. Hier mag die Tatsache, daß die Aminosäure als aktives Acetylprodukt erhalten wird, einige Überlegungen über den Mechanismus der Aminosäurebildung rechtfertigen.

Wir haben gerade mit Rücksicht auf die hier gefundene Umkehrbarkeit der ersten Phase des Aminosäureabbaues die intermediäre Bildung einer hypothetischen Oxyaminosäure



diskutiert, eine Annahme, für die sich inzwischen auch Neubauer und Fromherz zur Erklärung ihrer Beobachtungen ausgesprochen haben.<sup>2)</sup> Diese Säure, die dem Aldehydammoniak entspräche, kann einerseits durch Eintritt von 1 Atom O aus der Aminosäure, andererseits durch Anlagerung von 1 Molekül  $\text{NH}_2$  aus der Ketonsäure entstehen. Sie ist zweifellos labil, wie das von den Iminosäuren, ihren Anhydriden, bekannt ist, die allerdings recht ungenügend beschrieben sind.<sup>3)</sup> Die Säure würde nun, wenn die Bedingungen zur Oxydation vorherrschen, unter Ab-

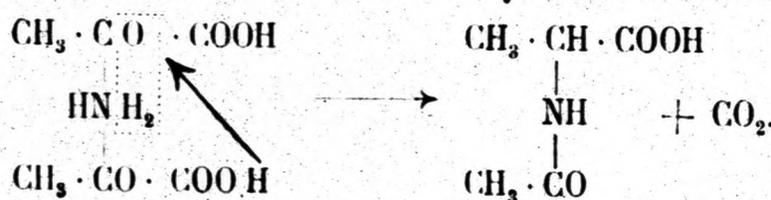
<sup>1)</sup> 6 g Phenyl- $\alpha$ -oxybuttersäure, synthetisch gewonnen, lieferten 0,12 g des gleichen Produktes. Der Versuch soll womöglich mit den beiden optischen Isomeren weitergeführt werden, da diese Untersuchung Ergebnisse über das verschiedene Schicksal der Stereoisomeren zu versprechen scheint.

<sup>2)</sup> Neubauer und Fromherz, Diese Zeitschrift, Bd. LXX, S. 338 (1911).

<sup>3)</sup> Böttinger, Annalen der Chem. u. Pharm., Bd. CCVIII, S. 122 (1881).

spaltung von  $\text{NH}_3$  zur Keton säure und durch Eintritt von einem Atom O zur nächst niederen Säure abgebaut, wenn dagegen die Bedingungen zur Reduktion vorherrschen, unter Abspaltung von  $\text{H}_2\text{O}$  und Aufnahme von  $\text{H}_2$  zur Aminosäure reduziert werden. Ob beide Prozesse nebeneinander verlaufen können, ob nicht sogar ein Prozeß die Ursache des andern darstellen kann und so nach Art der Canizzarischen Aldehydulagerung in Analogie zu den interessanten Befunden von Parnas<sup>1)</sup> zugleich ein Molekül Aminosäure (bzw. Oxysäure) und ein Molekül Phenylpropionsäure entstehen, die dann die Mutter substanz der Hippursäure darstellt, das müssen weitere Untersuchungen entscheiden.

Durch solche Vorstellungen wäre die Bildung der Oxysäure und der Aminosäure durch gleiche Prozesse erklärt, und es wäre lediglich eine Frage der Konzentration an disponiblen Ammoniak, ob die Amino- oder die Oxysäure entsteht. Durch Zusatz von  $\text{NH}_4$ -Salzen müßten die Mengen von Oxysäure zugunsten der Aminosäure zurückgehen, und mit dieser Form der Fragestellung ließe sich vielleicht die Frage nach der Größe der intermediären Ammoniakbildung beim Abbau der Aminosäuren angreifen. Ob Bedingungen zur Reduktion oder Oxydation vorherrschen, wird vermutlich abhängig sein von der Anwesenheit weiterer, leicht oxydabler Substanzen, die in diesem Fall die Reduktion bewirken könnten. Hier ist vor allem an die Kohlenhydrate oder deren Abbauprodukte zu denken — und in die gleiche Richtung führt auch die Tatsache, daß die Aminosäure als Acetylprodukt vorliegt, dessen Bildung an eine Reaktion von Erlenmeyer jun.<sup>2)</sup> und de Jong<sup>3)</sup> erinnert. Danach können 2 Moleküle Brenztraubensäure mit  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  bei Zimmertemperatur zusammengebracht unter Entwicklung von Wärme 1 Molekül Acetylalanin bilden.



<sup>1)</sup> Parnas, Biochem. Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 274 (1910).

<sup>2)</sup> Annalen der Chemie, Bd. CCCVII, S. 146 (1899).

<sup>3)</sup> de Jong, Recueil des Travaux, Bd. XIX, S. 259 (1900).

Bei dieser Reaktion reduziert in der Tat ein Molekül Ketonsäure das andere, und spaltet man das Reaktionsprodukt, so sind nebeneinander 1 Molekül Aminosäure und 1 Molekül der nächst niederen Fettsäure entstanden, qualitativ die gleichen Produkte, die der Tierkörper bildet.<sup>1)</sup> Nun liegt auch hier die Aminosäure als Acetylprodukt vor, — das legt den Gedanken an eine Beteiligung von Brenztraubensäure bei diesem Acetylierungsprozeß nahe, der inzwischen mehrfach beobachtet worden ist. Neubauer hat mit Warburg<sup>2)</sup> zusammen zeigen können, daß eine Substanz, die sie bei der Durchblutung mit Phenylamidoessigsäure gefunden und anfangs für eine Uraminosäure gehalten hatten, ebenfalls das Acetylderivat ist. Weiter haben Neubauer und Fromherz gefunden, daß das gleiche Acetylprodukt in Form des optischen Antipoden auch von der Hefe aus der Aminosäure gebildet wird. Die Acetylierung stellt also offenbar einen Prozeß dar, dem eine weitergehende Verbreitung zukommt.

Für diese Acetylierung möchte ich, wie schon früher erwähnt,<sup>3)</sup> die Brenztraubensäure herbeiziehen, die nach obiger Reaktion aus Ketonsäuren und Ammoniak die zugehörigen Acetylaminosäuren bilden kann. Die Entstehung der Brenztraubensäure ließ sich bisher außer aus Alanin vor allem aus den Kohlenhydraten über die Milchsäure ableiten. Die ganzen Untersuchungen im Gebiet des Säureabbaues haben nun gezeigt, daß bei den physiologischen Veränderungen der Substanzen im Tierkörper fortgesetzt Reduktionen und Oxydationen nebeneinander verlaufen, es liegt deshalb gar kein Grund vor, für die Kohlenhydrate ein Abbauschema vorzuziehen, das nach Analogie der Alkalisplaltung, als Zwischenprodukt etwa Glycerinaldehyd, Methylglyoxal, Milchsäure vorsieht und nur Kohlenstoffkettensprengung sowie Wasserabspaltung und -Anlagerung unter Ausschluß intermediärer Oxydations- und Reduktionsvorgänge annimmt, also Prozesse, die thermodynamisch möglichst

<sup>1)</sup> Auch die Acetylierung des p-Nitrobenzaldehydes zu Acetylaminobenzoessäure geht mit Reduktion und Oxydation nebeneinander einher.

<sup>2)</sup> Neubauer und Warburg, Diese Zeitschrift, Bd. LXX, S. 3 (1910).

<sup>3)</sup> Knoop, a. a. O., S. 499.

in einer Richtung verlaufen. Demgemäß diskutiert nunmehr Neubauer,<sup>1)</sup> der auch für die Bildung der Alkohole aus Aminosäuren durch Hefepilze intermediär Oxydationen und Reduktionen nachwies, für den Kohlenhydratabbau die Bildung von Brenztraubensäure als primäres oxydatives Spaltungsprodukt, das erst sekundär durch Reduktion in Milchsäure übergehen könnte. Diese Annahme hat viel für sich, — sie erklärt z. B., daß Milchsäure vor allem immer bei ungenügender Sauerstoffzufuhr gefunden worden ist, dann also, wenn im Tierkörper vermutlich Reduktionsbedingungen vorherrschen.

Die Frage, welche Rolle die Brenztraubensäure beim Kohlenhydratabbau spielt, hat Neubauer sich vorbehalten, und wir erwähnen hier nur, daß auch dieser Forscher ihr Vorkommen annimmt, und interessieren uns für ihre Mitwirkung bei dem Acetylierungsprozeß. Dieser erscheint uns auch bei der Verfütterung der racemischen Aminosäuren kein einfacher zu sein, denn auch das racemische Produkt ergab nur d-Acetylaminosäure. Wenn etwa Essigsäure die Acetylierung vornimmt, so bedarf es besonderer Erklärungen dafür, daß nur die eine Komponente acetyliert erscheint, eine Tatsache, für die sich freilich Analoga finden. Da aber Keton- und Aminosäure dasselbe Acetylprodukt liefern, so wird dieses hier vermutlich in gleicher Weise wie die Oxysäure ebenfalls aus einem gemeinsamen Zwischenprodukt gebildet, und das müßte die Keton- oder Iminosäure sein. Entsteht die Acetylaminosäure auf diese Weise, so wird ein asymmetrisches Kohlenstoffatom im Tierkörper neugebildet, und in dem Falle können wir das Auftreten nur der einen aktiven Stereoisomeren erwarten. Auch Neubauers Acetylprodukte sind beide optisch aktiv, und da die spezifische Drehung des bei der Durchblutung gewonnenen Produktes nach rechts ebenso stark ist, wie die des Hefeproduktes nach links, so sind beide mit großer Wahrscheinlichkeit frei von ihren optischen Antipoden. Auch das spricht eher für die Bildung aus einem inaktiven Zwischenprodukt, als für direkte Acetylierung. Aufklärung kann hier die Verfütterung der l-Aminosäure geben.

<sup>1)</sup> Neubauer, Diese Zeitschrift, Bd. LXX, S. 350 (1911).

die nicht als Acetylprodukt erscheint. Liefert sie acetylierte d-Aminosäure, so ist damit ein Umbau bewiesen, für den wohl nur der hier angenommene Weg über die besprochenen Zwischenprodukte in Betracht kommen kann.

Die leichte Reduzierbarkeit einer Ketonsäure bei Anwesenheit von Ammoniak zur Aminosäure hat sich experimentell beweisen lassen: Läßt man in absoluten mit Ammoniak gesättigten Alkohol eine alkoholische Lösung von Phenylbrenztraubensäure eintropfen und entwickelt zu gleicher Zeit Wasserstoff, so kann man bereits bei Verwendung eines so schwachen Reduktionsmittels wie des Aluminiumamalgams Phenylalanin gewinnen.

Für die Frage, ob hier im physiologischen Versuch noch Brenztraubensäure beteiligt ist, hoffen wir ebenfalls experimentelles Material zunächst *in vitro* und dann im Fütterungs- und Durchblutungsversuch beibringen zu können.