

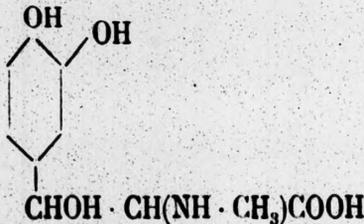
Dioxyphenylalanin, eine neue Aminosäure aus *Vicia faba*.

Von
M. Guggenheim.

(Physiologisch-chemisches Laboratorium der Firma F. Hoffmann-La Roche & Cie.,
Grenzach.)

(Der Redaktion zugegangen am 22. Oktober 1913.)

In einem Sammelreferat über proteinogene Amine¹⁾ hatte ich darauf hingewiesen, daß auch das Adrenalin zu dieser Körperklasse gerechnet werden kann, wenn man ihm die hypothetische 3,4-Dioxyphenyl- α -methylamino- β -oxypropionsäure



als Muttersubstanz zugrunde legt. Es erschien mir daher von großem Interesse, als vor einiger Zeit Torquato Torquati²⁾ über das Vorkommen einer stickstoffhaltigen, Brenzkatechinreaktion gebenden Substanz in den Fruchtschalen und Keimlingen von *Vicia faba* berichtete. Das Verhalten und die Reak-

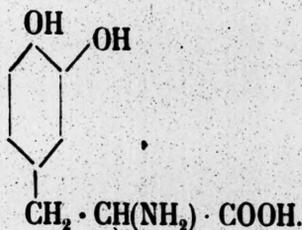
¹⁾ M. Guggenheim, Therap. Monatsh., Bd. 27 (1913). — Die hypothetische Aminosäure wurde dort als 1,2-Dioxyphenyl-4- α -methylpropionsäure bezeichnet. In Übereinstimmung mit früheren Autoren erfolgt in dieser Arbeit die Numerierung der Substituenten von der aliphatischen Seitenkette ausgehend.

²⁾ Torquato Torquati, Über die Gegenwart einer stickstoffhaltigen Substanz in den Keimlingen von *Vicia faba*. Arch. di farmacol. speriment., Bd. 15, S. 213—23.

Torquato Torquati, Über die Gegenwart einer stickstoffhaltigen Substanz in den grünen Hülsen von *Vicia faba*. Arch. di farmacol. sperimentale, Bd. 15 (1913), S. 308—12.

tionen der von Torquati beschriebenen Substanz ließen es wahrscheinlich erscheinen, daß hier eine nahe Verwandte der von mir angenommenen Adrenalinmuttersubstanz vorliegen müsse.

Indem ich mich im wesentlichen an die von Torquati gemachten Angaben hielt, gelang es mir, eine größere Quantität der erwähnten Substanz in schön krystallisiertem Zustande zu erhalten. Eine eingehende chemische Untersuchung deutete nun darauf hin, daß das isolierte stickstoffhaltige Brenzkatechin-derivat sehr wahrscheinlich als 3,4-Dioxyphenyl- α -aminopropionsäure



anzusprechen ist.

Für diese Konstitution spricht einerseits die Elementaranalyse, deren Zahlen von denen Torquatis etwas abweichen und die sehr gut auf die Formel $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_4\text{N}$ stimmen. Die Existenz zweier o-ständiger Oxygruppen erhellt aus der FeCl_3 -Reaktion, sowie aus dem Verhalten gegen Schwermetallsalze. Die p-Stellung der Seitenkette ließ sich durch Überführung in Protokatechusäure beweisen. Das Vorhandensein einer Aminogruppe ergibt sich aus der Identität der nach van Slyke und nach Kjeldahl erhaltenen Stickstoffzahlen, sowie aus der optischen Aktivität der Verbindung. Es gelang ferner, ein gut krystallisierendes Tribromderivat sowie ein Tribenzoylderivat herzustellen.

Dioxyphenylalanin ist bis jetzt in der Natur nicht nachgewiesen worden. Synthetisch wurde die Substanz von Casimir Funk¹⁾ hergestellt. Die von ihm gemachten Angaben stimmen ziemlich gut mit den von uns erhaltenen Befunden. Der Umstand, daß der Schmelzpunkt seiner Substanz etwas tiefer ($263\text{--}270^\circ$ statt 280°) liegt, läßt sich leicht durch die Tatsache erklären, daß er die dl-Form in Händen hatte, während in dem natürlich vorkommenden Produkt die l-Form vorliegt.

¹⁾ Casimir Funk, Synthese des d,l-3,4-Dioxyphenylalanins. Journ. Chem. Soc., London, Bd. 99, S. 554—57.

Es wird nun die Aufgabe sein, durch Herstellung des synthetischen Produktes, Spaltung in die beiden optisch aktiven Komponenten und Vergleich mit der natürlichen Substanz einen endgültigen Beweis für die von uns angenommene Konstitution zu erbringen.

Die Auffindung einer neuen Aminosäure gewährt nach verschiedener Seite hin interessante Ausblicke. Es ist einerseits damit der Beweis geliefert, daß in der Natur tatsächlich Aminosäuren vorkommen, welche der von uns angenommenen hypothetischen Adrenalinmuttersubstanz sehr nahe stehen.

Andererseits muß uns die Entdeckung dieser Substanz von neuem darauf aufmerksam machen, daß mit den bis jetzt isolierten Aminosäuren wohl noch lange nicht alle Bausteine des Eiweißes bekannt sind, ja vielleicht fehlt gerade ein Teil der biologisch wichtigeren noch. Jeder, der einmal eine Säurehydrolyse eines Proteins durchgeführt hat, weiß, daß es selten gelingt, über 50 oder 60% der theoretisch zu erwartenden Menge an Aminosäuren zu isolieren. Ein großer Teil bleibt oft als sogenannte melaninartige Substanz in einem undefinierbaren Rückstand, ein anderer Anteil geht bei den verwendeten Isolierungsmethoden sonstwie verloren. Ob dies nicht gerade die empfindlichen, den verwendeten Agenzien nicht widerstehenden Aminosäuren sind? Gerade z. B. das Dioxyphenylalanin würde eine Säurehydrolyse nicht ertragen. Es würde bei der Einwirkung der Luft und der Säure in ein schwarzes, schwerlösliches Pigment übergehen.

Im Tierkörper wird Dioxyphenylalanin nur unvollständig verbrannt. In einem Kaninchenversuch, sowie in einem Selbstversuch zeigte sich, daß ein Teil der Aminosäure zu Protokatechusäure oxydiert wird, ein anderer Teil scheint unverändert ausgeschieden zu werden.

Es muß also noch dahingestellt bleiben, ob diese Aminosäure auch im tierischen Körper vorkommt. Es ist ebenfalls noch unentschieden, ob sie zum Aufbau von Eiweiß verwendet wird oder ob sie nur in freiem, nicht peptidartig gebundenem Zustande vorkommt. Alles das sind Fragen, welche durch weitere Untersuchungen entschieden werden müssen.

Immerhin dürften diese Befunde vielleicht ermuntern, mit der Suche nach neuen, leicht veränderlichen Aminosäuren in den verschiedenen Organeiweißarten nicht nachzulassen, namentlich aber die bei der Säurehydrolyse entstehenden melanin- und harzartigen Nebenprodukte nicht mehr als «quantité négligeable» zu betrachten.

Experimenteller Teil.

Die Isolierung der Dioxyphenylaminopropionsäure erfolgte im Prinzip nach den Angaben Torquatis (l. c.). Sie beruht also auf der Schwerlöslichkeit ihrer Bleiverbindung in ammoniakalischer Lösung. 10 kg von den von den Samen befreiten Fruchtschalen werden mit einer verdünnten Lösung von schwefliger Säure behandelt, dann in einer Fleischhackmaschine fein zerkleinert. Die Vorbehandlung mit schwefliger Säure verhindert die Oxydation, welche sonst sehr rasch erfolgt, namentlich bei der Berührung mit den Eisenbestandteilen der Hackmaschine. Die zerkleinerte Masse wird mit Essigsäure deutlich angesäuert und mit ca. 30 l Wasser extrahiert. Das trübe, schwach grünliche Filtrat wird mit 2½ l 20%iger Bleiacetatlösung versetzt. Der reichliche, gut absitzende Niederschlag wird abfiltriert und ausgewaschen. Er enthält kein oder nur sehr wenig Dioxyphenylalanin. Das Filtrat wird mit Ammoniak deutlich lackmusalkalisch gemacht, wobei sich ein reichlicher, gelblich-weißer Niederschlag absetzt. Dieser wird abgesaugt und mehrmals mit Wasser ausgewaschen. Schließlich wird in ca. 5 l Wasser aufgeschlemmt und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Das vom Bleisulfid abfiltrierte schwach gelbliche Filtrat wird im Wasserstoff- oder Kohlensäurestrom bei ca. 15 mm Druck stark konzentriert. Das Dioxyphenylalanin scheidet sich dabei als gelblich-weißes, krystallinisches Pulver ab. Die Ausbeute ist recht beträchtlich. Aus 10 kg frischen Schalen erhält man ca. 25 g Rohprodukt. Aus der Mutterlauge lassen sich noch geringe Mengen durch erneute Fällung mit Bleiacetat isolieren.

Zur Reinigung wurde die rohe Aminosäure aus heißem Wasser, welches mit einer geringen Menge schwefliger Säure

versetzt war, bei Zusatz von etwas Tierkohle umkrystallisiert. Sie wurde schließlich je nach den Krystallisationsbedingungen in schön ausgebildeten, derben Prismen oder in feinen Nadelchen erhalten. Im Kapillarröhrchen erhitzt, zersetzt sich die Substanz bei 280° (unkorr.).

Analysen.

- I. 0,1385 g Substanz gaben 0,0679 g H₂O und 0,2745 g CO₂.
 II. 0,1319 „ „ „ 0,0661 „ „ „ 0,2612 „ „
 III. 0,115 „ „ „ nach van Slyke bei 740 mm Druck und 24° C. 14,6 ccm N₂.
 IV. 0,2016 „ „ „ brauchten nach Kjeldahl 10,2 ccm $\frac{1}{10}$ -n-H₂SO₄.

Berechnet	Gefunden:			
für C ₉ H ₁₁ O ₄ N (197,12):	I.	II.	III.	IV.
C = 54,79%	C = 54,06%	54,01%	—	—
H = 5,62%	H = 5,63%	5,62%	—	—
N = 7,12%	N = —	—	6,90%	7,09%

Zur optischen Bestimmung wurden 1,092 g in 10,0450 g normaler Salzsäure gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 11,137 g. α_D^{20} im 1 dm-Rohr = — 1,40°.

$$[\alpha]_D^{20} = -14,28^\circ (\pm 0,2^\circ).$$

Die Löslichkeits- sowie Fällungsreaktionen der Substanz sind zum Teil schon von Torquati beschrieben. Sie ist wenig löslich in kaltem Wasser, ein Teil in 200 Teilen bei 20°. In kochendem Wasser löst sich ein Teil in 40 Teilen. Einmal gelöst, scheidet sich die Substanz beim Erkalten nur allmählich wieder aus. In Alkohol, sowie in sämtlichen indifferenten Lösungsmitteln und in Eisessig ist sie unlöslich.

In Soda löst sie sich mit schwach gelber Farbe. Die Lösung wird durch Luftzutritt allmählich rotbraun. Die Lösung in Ätzalkalien ist, sofern man im Wasserstoffstrom arbeitet, gelb; sie wird bei Luftzutritt rot.

Verdünnte Mineralsäuren lösen die Substanz leicht unter Bildung von Salzen. Das salzsaure Salz scheidet sich beim Eindunsten der Lösung im Exsikkator in durchsichtigen, derben Prismen ab, welche über konzentrierter Schwefelsäure oder Chlorcalcium verwittern.

Ein Pikrat konnte nicht erhalten werden.

Die wässrige Lösung der Aminosäure gibt mit HgCl_2 keine Fällung. Erst bei Zusatz von Soda scheidet sich ein brauner, flockiger Niederschlag ab. Neutrales Bleiacetat gibt auf Zusatz von Ammoniak eine weiße flockige Fällung. Silbernitrat wird schon in der Kälte sofort reduziert. Eine etwas konzentriertere Eisenchloridlösung, 1—5%, gibt eine schöne, smaragdgrüne Färbung, welche längere Zeit bestehen bleibt. Eine verdünnte (1‰ige) Eisenchloridlösung gibt nur eine vorübergehende Grünfärbung; durch weiteren Zusatz von Eisenchlorid läßt sich dann keine bleibende Grünfärbung mehr erzielen.

Beim Kochen mit Kupfercarbonat geht dieses unter CO_2 -Entwicklung in Lösung; diese ist zuerst hellblau, nimmt aber bald einen etwas dunkleren Ton an und oxydiert sich beim Eindampfen, so daß kein krystallisiertes Kupfersalz erhalten werden konnte. Auch metallisches Kupferpulver löst sich bei längerem Kochen.

Millonsches Reagens bewirkt eine orangerote, Diazobenzolsulfosäure eine tief rotbraune Färbung. Phosphorwolframsäure gibt keine Fällung, die Lösung färbt sich allmählich rotviolett.

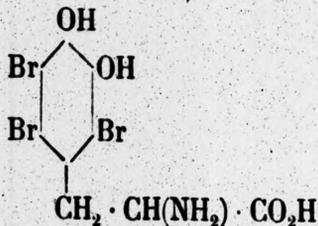
Beim Kochen der Aminosäure mit der fünffachen Menge gesättigtem salzsaurem Alkohol im CO_2 -Strom geht die Substanz in Lösung. Beim Eindunsten im Exsikkator hinterbleibt das salzsaure Salz des Dioxyphenylalaninesters als schwach rosaviolett gefärbter, sehr hygroskopischer Sirup, wenig löslich in Äther, leicht löslich in Alkohol.

Überführung in Protokatechusäure.

0,5 g der Substanz wurden in 5 g geschmolzenes Ätzkali eingetragen. Die Schmelze färbt sich intensiv gelb und entwickelt lebhaft Ammoniak. Sie wurde bis zum Aufhören der Gasentwicklung erhitzt, in Wasser aufgenommen, angesäuert und ausgeäthert. Der Äther hinterließ einen krystallinen Rückstand, der aus Wasser umkrystallisiert bei 195° schmolz.

Die Substanz gab mit Eisenchlorid eine Grünfärbung, welche auf Zusatz von Soda rot wurde.

Tribromdioxyphenylalanin.



1 g der Substanz wurde im Exsikkator unter einer Glasglocke neben einem Schälchen mit Brom längere Zeit Bromdämpfen ausgesetzt. Sie färbt sich dabei zuerst violett, wurde dann wieder weiß, um schließlich zu einem gelblichen Sirup zu zerfließen. Dieser wurde mit schwefliger Säure aufgenommen, mit Soda schwach alkalisch gemacht und schließlich mit Essigsäure angesäuert. Es schieden sich reichlich fein verflochtene, farblose Nadelchen ab. Diese schmelzen bei ca. 200° (unkorr.) unter Zersetzung. Sie enthalten Brom und Stickstoff, sind wenig löslich in kaltem, leicht löslich in heißem Wasser. Die wässrige Lösung wird durch FeCl₃ nach rasch vorübergehender Grünfärbung tiefblau gefärbt. Nach dem Trocknen bei 100° ergaben 0,2846 g nach Carius 0,3680 g AgBr.

Berechnet für C₉H₈O₄NBr₃ (434,0): Gefunden:

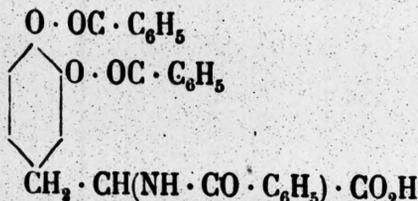
$$\text{Br} = 55,27\%$$

$$\text{Br} = 55,30\%$$

Offenbar liegt also ein Tribromsubstitutionsprodukt vor.

Schüttelt man eine alkalische Lösung der Aminosäure mit Jod, so scheidet sich sofort ein schwarzes, amorphes, in Wasser wenig lösliches Pigment ab.

Tribenzoyldioxyphenylalanin.



Um ein Benzoylprodukt des Dioxyphenylalanins zu erhalten, wurde nach den Angaben von E. Fischer¹⁾ in Bicarbonatlösung benzoyliert. 1 g Dioxyphenylalanin wurde in 200 ccm 10%igem Bicarbonat suspendiert und so lange mit

¹⁾ E. Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. 32 (1899). S. 2451.

6,3 g Benzoylchlorid geschüttelt, bis der Geruch verschwunden war. Es schied sich dabei ein voluminöser, amorpher, weißer Niederschlag ab. Dieser wurde nach dem Trocknen in wenig Eisessig gelöst und durch Zusatz von Wasser ausgefällt. Feine, weiße Nadelchen, deren Schmelzpunkt unscharf bei 170° liegt. Wenig löslich in heißem Wasser, leicht löslich in Eisessig und in Alkohol.

0,4250 g brauchten nach Kjeldahl 8,8 ccm $\frac{1}{10}$ -n- H_2SO_4 .

Berechnet für $\text{C}_{30}\text{H}_{23}\text{O}_7\text{N}$ (509,17): Gefunden:

N = 2,75%

N = 2,90%

Beim Kochen mit Alkali verseift sich das Produkt unter Rotfärbung.

Verhalten im Tierkörper.

1 g der Substanz wurde einem Kaninchen von 2200 g per os zugeführt. Das Tier zeigte keinerlei ungewöhnliche Symptome. Der Harn wurde mit 20%igem Bleiacetat versetzt und filtriert. Das Filtrat wurde alkalisch gemacht und der flockige Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Aus der konzentrierten Lösung konnte eine in Äther lösliche Substanz extrahiert werden, welche mit Eisenchlorid eine grüne Färbung gab. Hingegen hinterblieb in der wässrigen Mutterlauge eine mit Äther nicht extrahierbare Substanz, welche ebenfalls eine positive Brenzkatechinreaktion zeigte.

Ein ähnliches Resultat ergab ein Selbstversuch, bei dem $2\frac{1}{2}$ g der Aminosäure eingenommen wurde. Hingegen zeigte sich hierbei, daß die Substanz nicht völlig unschädlich ist. Ca. 10 Minuten nach der Einnahme empfand ich große Übelkeit, ich mußte mich zweimal erbrechen, sodaß also die Substanz nicht völlig resorbiert wurde.

Die Aufarbeitung des Harns, welche in gleicher Weise wie beim Kaninchen erfolgte, gab im wesentlichen dasselbe Resultat. Hingegen zeigte sich, daß der nach 5 Stunden gelassene Harn eine andere Eisenchloridreaktion ergab als der nach 2 Stunden. Untersucht man diesen, so zeigt sich mit Eisenchlorid die übliche Grünfärbung. Der nach 5 Stunden erhaltene Harn gibt in neutraler und schwachsaurer Lösung nur

eine allmähliche Dunkelfärbung, während in ammoniakalischer Lösung eine schöne blaue Färbung resultierte, die allmählich ins Violette verblaßte.

Dioxyphenylalanin ist wie alle bisher bekannten Aminosäuren pharmakologisch ziemlich indifferent. 2 cg, einem mittelgroßen Kaninchen intravenös injiziert, ergaben keine wesentliche Veränderung der Blutdruck- und Atmungskurve. Ebenso besitzt das Dioxyphenylalanin keine Wirkung auf überlebende, glattmuskuläre Organe (Üterus, Darm).
