

# Über den Abbau des m-Methylphenylalanins im Organismus.

## I. Mitteilung.

Von

Ludwig Böhm.

---

(Aus der medizinischen Poliklinik in Freiburg. Direktor: Prof. Dr. Morawitz).

(Der Redaktion zugegangen am 6. Dezember 1913.)

---

Wenn es auch eine Reihe aliphatischer Substanzen gibt, die nur unvollständig vom Organismus oxydiert werden können, so werden die Stoffe der Fettreihe doch im allgemeinen weit leichter verbrannt als die der aromatischen Reihe, die zwar immer mehr oder minder stark verändert werden, aber doch gewöhnlich ein den Benzolkern enthaltendes Bruchstück zur Ausscheidung gelangen lassen. Wie aus den Untersuchungen von Neubauer, Knoop, Embden und andern hervorgeht, werden eigentlich nur die beiden natürlichen aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin sowie ihre nächsten Verwandten, die entsprechenden Keton- und Oxysäuren, vollständig verbrannt. Sowie die Seitenkette länger oder kürzer ist oder am  $\beta$ -Kohlenstoffatom substituiert ist, bleiben wesentliche Mengen von unverbrannten Bruchstücken zurück.

Auch die Beschaffenheit des Kerns, nicht nur der Seitenkette, ist von wesentlicher Bedeutung für die Verbrennbarkeit einer Substanz. Eine OH-Gruppe in p-Stellung zur Seitenkette wie im Tyrosin stört den Abbau nicht. Schon die in o-Stellung oder in m-Stellung befindliche OH-Gruppe im o- oder m-Tyrosin verhindert nach Flatow<sup>1)</sup> und Blum<sup>2)</sup> die vollständige Verbrennung. Halogensubstitution im Benzolkern führt offenbar ebenfalls zu schwer verbrennbaren Stoffen. Das von Flatow<sup>1)</sup> verfütterte m-Chlorphenylalanin ebenso wie das von Friedmann

---

<sup>1)</sup> Flatow, Diese Zeitschrift, Bd. 64, S. 391, 1910.

<sup>2)</sup> Blum, Archiv f. exp. Pathologie und Pharmakologie, Bd. 59, S. 269 (1908).



lichkeit der Bildung eines Chinols ist an die Bedingung geknüpft, daß in p-Stellung zur Seitenkette entweder kein Substituend oder die OH-Gruppe sich befindet. Ein anderer Substituend daselbst müßte zunächst durch Oxydation entfernt werden, würde also die Chinolbildung verhindern oder wenigstens erschweren. Von diesem Gedankengang ausgehend prüften Dakin und Wakemann<sup>1)</sup> p-Methyl- und p-Methoxyphenylalanin und zeigten, daß diese Substanzen verbrannt werden und bei der Leberdurchblutung Acetessigsäure liefern. Daraus schließen sie, daß es für den Organismus jedenfalls Abbauege für den Benzolkern gibt, die nicht über ein chinolartiges Zwischenprodukt führen.

Immerhin war die Oxydation dieser p-substituierten Aminosäuren keine so vollständige, und besonders bei einem Versuch am Alkaptonuriker,<sup>2)</sup> der nur 5 g der Substanz bekommen hatte, wurden allein über 20% der verfütterten Aminosäure wieder im Harn als Acetylaminosäure aufgefunden. Konnte man aus den Versuchen von Dakin und Wakemann den Schluß ziehen, daß es andere Abbauege gibt als den über ein Chinol als Zwischenprodukt, so ließen dieselben doch darüber keinen Einblick zu, ob diese andern Wege nur Nebenwege sind neben einem bevorzugten Weg über das Chinol, oder ob es etwa eine Möglichkeit der letzteren Art überhaupt nicht gibt.

Die Annahme der Chinole als Zwischenprodukte, die ja immer nur auf den Befunden bei der Alkaptonurie beruhte, und durch die Dakinschen Resultate überflüssig erscheint, ließe sich nur durch Isolierung eines Chinols im Organismus wirklich beweisen. Für eine solche ist jedoch wenig Aussicht vorhanden bei der großen Reaktionsfähigkeit und Unbeständigkeit dieser Körper. Schon die Darstellung geeigneter Chinole zur physiologischen Prüfung stößt auf starke Schwierigkeiten.<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> Dakin u. Wakemann, Journal of biological Chemistry. Bd. 9, S. 139.

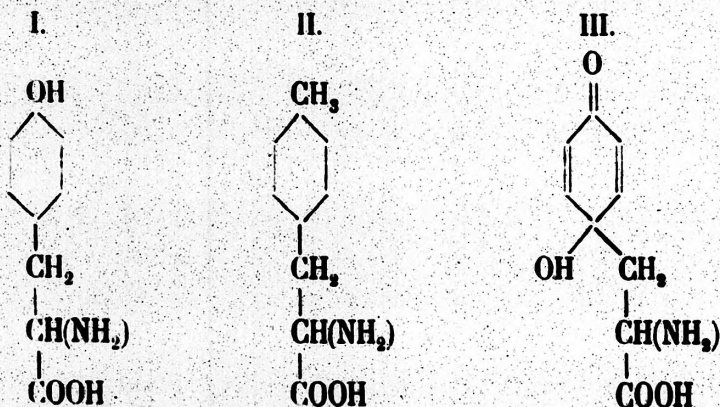
<sup>2)</sup> Dakin, ebenda, Bd. 8, S. 11.

<sup>3)</sup> Friedmann, Hofmeisters Beiträge, Bd. 11, S. 304.

<sup>4)</sup> Vgl. die Untersuchungen von Friedmann<sup>3)</sup> und Tannhauser, (Dissertation, München 1910).

Es bleibt zur Klärung der verschiedenen Abbaumöglichkeiten der aromatischen Substanzen die Untersuchung verschieden konstituierter, im Kern substituierter Derivate der physiologischen aromatischen Aminosäuren. Mit solchen mußte sich zeigen lassen, welche Substitutionen den Abbau des Benzolkerns erschweren, welche ihn nicht stören. Ferner läßt sich bei diesem Vorgehen erhoffen, im Harn Abbauprodukte zu finden, die auf den Mechanismus des Kernabbaus Schlüsse zulassen.

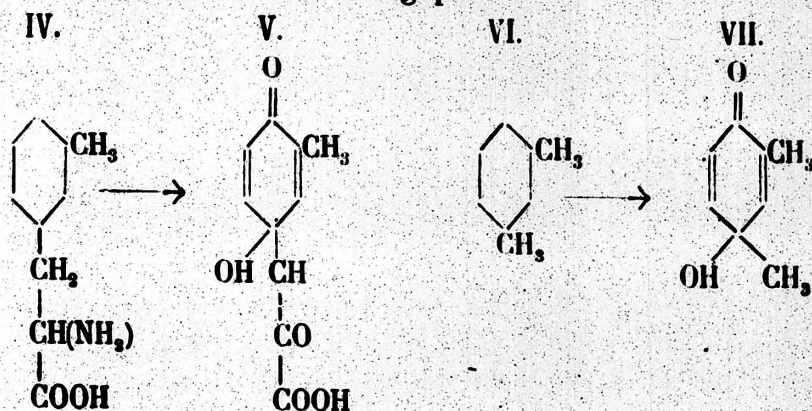
Wir sahen in den Arbeiten von Flatow sowie von Friedmann und Maasse, daß die Halogen-, speziell Chlorsubstitution an jeder Stelle des Kerns den Abbau erschwert. Tritt dagegen eine Hydroxylgruppe in den Kern ein, dann ist die Stelle derselben für den Abbau maßgebend. Tritt sie in p-Stellung zur Seitenkette, wie im natürlichen Tyrosin, dann wird die Verbrennung eher begünstigt, als erschwert. In Ortho- oder Metastellung erschwert sie jedoch die Zerstörung des Kerns oder verhindert sie, wie Blum und Flatow am o- und m-Tyrosin zeigten. Indem Dakin zeigte, daß Methyl- oder Methoxylsubstitution in p-Stellung zur Seitenkette nur eine geringe Erschwerung des Abbaus bedeutet, lag es nahe, anzunehmen, daß auch bei diesen Substituenten die Konstitution des Moleküls von ausschlaggebender Bedeutung sei. Lediglich der Konfiguration nach wäre ja das p-Tyrosin Dakins (II) dem physiologischen Tyrosin (I) das entsprechendere. Es konnte jedoch wegen der Methylgruppe nicht wie jenes in das Chinol (III) übergehen. Der Ausfall der Versuche Dakins sprach deshalb gegen die Chinolhypothese und konnte für



eine besondere Bedeutung der Konfiguration des Moleküls verwendet werden, ohne über nähere Ursachen dieser Bedeutung Aufschluß zu geben.

Die Untersuchung der andern Tolyllanine mußte zur Vervollständigung der Dakinschen Versuche dienen. Es konnte dadurch sich zeigen, ob wie bei den drei Tyrosinen nur die eine Konfiguration des Moleküls die Verbrennung begünstigt. Es mußten dann bei m und o größere Mengen von unvollständig oxydierten Abbauprodukten im Harn erscheinen. Die Chinolhypothese wäre damit einen weiteren Grad unwahrscheinlicher geworden. Es konnte jedoch auch sein, daß die Methylgruppe den Benzolkern für die Fermente des Organismus überhaupt nicht wesentlich unzugänglicher macht. Dann mußte vom Standpunkt der Chinolhypothese besonders das m-Tolyllalanin (IV) leicht verbrannt werden, da dessen Konstitution die Bildung eines Chinols (V) eher erleichtert, wie auch das Chinol (VII) des m-Xylols (VI) relativ unschwer zugänglich ist. <sup>1)</sup>

Ich habe deshalb zur Prüfung dieser Fragen auf Veranlassung von Herrn Dr. Fromherz das m-Tolyllalanin dargestellt und im Stoffwechselfersuch geprüft.

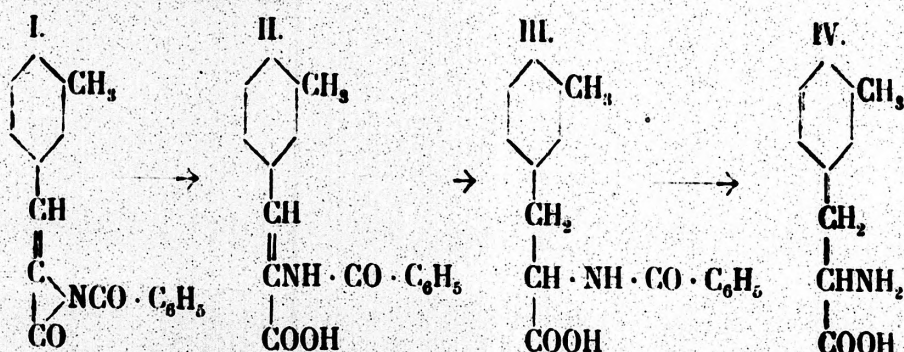


#### Darstellung des m-Methylphenylalanins.

Um zu dem gewünschten m-Tolyllalanin zu gelangen, haben wir den bequemen Weg von Erlenmeyer zur allgemeinen Darstellung von Aryllalaninen gewählt, und durch Kondensation von m-Tolylaldehyd mit Hippursäure, Reduktion des entstandenen Zimtsäurederivats und Abspaltung der Ben-

<sup>1)</sup> Lt. Reber, Dissert., Zürich 1903.

zoylgruppe die entsprechende Aminosäure mit dreigliedriger Seitenkette erhalten.



1. *m*-Methylbenzoylaminozimtsäure (II.): 30 g Hippursäure wurden mit 14 g wasserfreiem Natriumacetat fein pulverisiert und gut gemischt, dazu in einem Kölbchen 20 g *m*-Tolylaldehyd und 48 g Essigsäureanhydrid gebracht und auf dem Wasserbad 20 Minuten erhitzt. Die Masse verfärbt sich stark gelb und geht schließlich bis auf wenige Kryställchen in Lösung. In eine Schale ausgegossen erstarrt sie beim Erkalten, wird mit Wasser verrieben und auf der Nutsche scharf abgesaugt, zunächst mit viel kaltem, dann mit heißem Wasser, schließlich mit 20%igem Alkohol gut ausgewaschen. Das so gereinigte in gelben Nadeln krystallisierte Azlacton (I.) wurde sofort in verdünnter Natronlauge aufgeschwemmt und durch Erhitzen auf dem Wasserbad in Lösung gebracht. Nach dem Filtrieren wurde das erkaltete Filtrat mit Salzsäure angesäuert, wobei die Benzoylaminozimtsäure als knetbare Masse ausfällt, die beim Stehen krystallinisch erstarrt.

Das abfiltrierte und getrocknete Rohprodukt wird durch Umkrystallisieren aus heißem Aceton mit Zusatz von heißem Wasser in hellgelben Nadeln erhalten, die bei 202° schmelzen. Ausbeute: 60—70% der Theorie. Nach nochmaligem Umkrystallisieren aus absolutem Alkohol und Benzol mit Zusatz von Ligroin erhielten wir ein fast weißes feinkrystallinisches Produkt vom Schmelzpunkt 204,5° (unkorr.).

0,1877 g Substanz gaben 8,8 ccm N bei 22° und 750 mm.

$C_{17}H_{15}NO_3$  berechnet: N = 4,98%

gefunden: N = 5,10%

2. Benzoyl-*m*-Tolylalanin (III.): 10 g Benzoylamino-methylzimtsäure werden in etwa 100 g Wasser aufgeschwemmt

und 100 g etwa 2<sup>1</sup>/<sub>2</sub> % iges Natriumamalgam innerhalb von etwa einer halben Stunde portionenweise zugegeben.<sup>1)</sup> Das Amalgam verflüssigt sich ohne Gasentwicklung und die Säure geht bald in Lösung. Die schließlich schwach gelbgefärbte Lösung wird vom Quecksilber abgetrennt, filtriert und eine Stunde unter Zusatz von 30 ccm 33 % iger Natronlauge am Rückflußkühler gekocht, dann nach dem Erkalten mit Salzsäure angesäuert. Das Benzoyl-m-Tolylalanin fällt als weiche Schmiere aus, die beim Stehen fest wird und die man dann absaugt und mit Wasser auswäscht. Zur Reinigung ist zunächst ein Umkrystallisieren aus wenig Eisessig unerläßlich. Aus der 8fachen Menge dieses Lösungsmittels krystallisiert ein fast weißes Produkt in Blättchen vom Schmelzpunkt 185° (unkorr.). Zur Analyse haben wir das Präparat nochmals aus heißem Alkohol unter Zusatz von heißem Wasser umkrystallisiert, wodurch es in glänzenden weißen Blättchen vom F.P. 195° erhalten wurde. Ausbeute: an aus Eisessig umkrystallisierter Substanz 70% d. Th.

I. 0,1655 g Substanz gaben 0,4376 g CO<sub>2</sub> und 0,0935 g H<sub>2</sub>O.

II. 0,2637 g Substanz gaben 11,0 ccm N bei 17° und 739 mm Druck.

C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub> berechnet: C = 72,03% H = 6,06% N = 4,95%

gefunden: I. C = 72,10% H = 6,27% —

II. — — — N = 4,69%

3. m-Tolylalanin (IV.): Die Abspaltung der Benzoylgruppe machte zunächst einige Schwierigkeiten infolge der Eigenschaft der Benzoylaminosäure, sich schlecht mit der Salzsäure zu mischen und sich an der Oberfläche anzusammeln. Man kommt zum Ziel, wenn man 5 g Benzoylaminosäure 4 Stunden mit 12 % iger Salzsäure im Bombenrohr auf 140° erhitzt. Schließlich bewährte sich jedoch die Methode von Dakin besser, die Substanz mit der 100fachen Menge 20 % iger Salzsäure 12—24 Stunden, d. h. bis der größte Teil in Lösung gegangen ist, am Rückflußkühler zu kochen. Darnach wird heiß vom Ungelösten abfiltriert und nach dem Erkalten durch Absaugen und Ausäthern von der Benzoesäure abgetrennt. Die Lösung wird im Vakuum bis zur Trockene abdestilliert.

<sup>1)</sup> Es wird also ohne Schaden ein Überschuß von Natriumamalgam verwendet.

Der Rückstand in Wasser aufgenommen und eventuell zur Entfernung der Salzsäure nochmals abdestilliert. Im folgenden muß nun die außerordentlich hohe Löslichkeit der Aminosäure in Wasser berücksichtigt werden, man darf deshalb nur in möglichst wenig Wasser lösen und muß jede Verdünnung vermeiden. Die Lösung wird heiß filtriert, das Filtrat mit Ammoniak eben alkalisch gemacht, wieder filtriert, der Überschuß des Ammoniaks durch Kochen entfernt und dann rasch scharf durch Eis oder Kältemischung abgekühlt. Nur auf diese Weise erhielten wir die Aminosäure in Form eines Breis von feinen Krystallnadelchen, die nach Stehen im Eisschrank abgesaugt und mit wenig eiskaltem Wasser ausgewaschen wurden. Ausbeute: nicht mehr als 50% d. Th. Das so erhaltene *m*-Tolylalanin wurde in derselben Weise nochmals aus wenig heißem Wasser ohne Ammoniakzusatz umkrystallisiert und schmolz dann bei 245° (unkorr.). Es ist in Alkohol und Äther unlöslich, sehr leicht löslich in Wasser, bei jeder Reaktion. Es hat einen außerordentlich unangenehmen bitteren Geschmack und zeigt sich demnach hierin den Aminosäuren der aliphatischen Reihe mit verzweigter Kette entsprechend, während die entsprechende Aminosäure der *p*-Reihe, das von Dakin dargestellte *p*-Methylphenylalanin, geschmacklos ist, wie die aliphatischen Aminosäuren mit gerader Kette.

Das einmal aus Wasser umkrystallisierte *m*-Tolylalanin wurde analysiert:

- I. 0,1330 g Substanz gaben 0,3295 g CO<sub>2</sub> und 0,0920 g H<sub>2</sub>O  
 II. 0,1215 „ „ „ 0,3000 „ „ „ 0,0838 „ „  
 III. 0,2143 „ „ „ 15,1 ccm N bei 25,5° und 754 mm Druck.

C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub> berechnet: C = 67,04% H = 7,39% N = 7,82%

gefunden: I. C = 67,52% H = 7,66% —

II. C = 67,32% H = 7,65% —

III. — — — N = 7,74%

### Stoffwechselversuche.

#### Versuch I.

Einem etwa 12 kg schweren Hund wurden 3 g *m*-Tolylalanin subcutan injiziert, gelöst in wenig Wasser.



Der Harn wurde nach Einengen und Ansäuern ausgeäthert und schließlich mit dem Kutscher-Steudelschen Extraktionsapparat erschöpft. Das Ätherextrakt wurde durch Ausschütteln mit Bisulfit in zwei Fraktionen geteilt. Beide Fraktionen bestanden jedoch nur aus ganz geringen Mengen von Sirupen, aus denen definierbare Produkte nicht zu isolieren waren. Die Bisulfitfraktion gab mit Eisenchlorid keine Farb-reaktion und reduzierte nicht.

Dieser Versuch schon deutete auf eine sehr gute Verbrennbarkeit des m-Tolylalanins, die anscheinend sogar besser sein konnte als die des von Dakin untersuchten p-Tolylalanins. Da ein solcher Befund für die Schlüsse auf den Verbrennungsmodus des Benzolkerns von Bedeutung sein mußte, suchte ich ihn durch einen beweisenderen Versuch zu stützen. Zur besseren Demonstration der Verbrennbarkeit verfütterte ich eine größere Quantität der Aminosäure. Die Ausscheidung der gesuchten Abbauprodukte suchte ich durch Bestimmung der ätherlöslichen Säuren quantitativ zu verfolgen.

## Versuch II.

Bei gleichmäßiger gemischter Kost sammelte ich in einem Selbstversuch den Harn von 8 Uhr morgens bis 8 Uhr morgens quantitativ auf. Die Tagesmenge wurde nach Entnahme der Proben zur Stickstoffbestimmung mit Schwefelsäure 1 : 8 angesäuert bis zur kongosauren Reaktion und darauf vollständig unter vermindertem Druck auf ein kleines Volumen eingengt. Der eingengte Harn wurde 5 mal mit dem  $1\frac{1}{2}$ fachen Volumen Äther ausgeschüttelt und schließlich noch zwei Tage mit dem Kutscher-Steudelschen Apparat extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte wurden in heißem Wasser gelöst, mit Tierkohle gekocht und heiß filtriert, das Filter mit heißem Wasser gut ausgewaschen. Das Filtrat wurde mit  $\frac{n}{1}$ -Natronlauge titriert. Nur beim Versuchstag wurde das Filtrat auf 500 ccm aufgefüllt, und davon 50 ccm mit  $\frac{n}{10}$ -Natronlauge titriert. Der Stickstoff wurde nach Kjeldahl bestimmt. Die beigefügte Tabelle, in der die ätherlöslichen Säuren in den titrierten Kubikzentimetern  $\frac{n}{1}$ -Natron-

## Selbstversuch mit 16 g m-Methylphenylalanin.

	Versuchstage März 1913	Harn- menge ccm	Spez. Gew.	N pro die g	N %	Ätherlösliche Säuren	
I.	17./18. 8 <sup>h</sup> a.m.	1100	1020	9,46	0,86	18,6	
II.	18./19. >	1100	1030	11,0	1,00	14,5	
III.	19./20. >	1370	1020	11,7	0,84	21,8	
IV.	20./21. >	2440	1018	13,9	0,57	31,2	16 g in Dosen von 8 × 2 g
V.	21./22. >	1200	1025	9,7	0,81	21,8	
VI.	22./23. >	1550	1030	11,8	0,76	22,3	

lauge angegeben sind, veranschaulicht den Verlauf dieses Versuchs.

Am Versuchstag wurden 16 g m-Tolylalanin in 8 Portionen zu je 2 g, auf den Tag verteilt, eingenommen. Durch das notwendige Nachtrinken von Wasser ist am Versuchstag die Urinmenge mäßig vermehrt. Der Stickstoff ist leicht erhöht, etwa entsprechend dem eingeführten Aminosäurestickstoff. Die ätherlöslichen Säuren zeigen eine deutliche Vermehrung, die jedoch bei weitem nicht der eingeführten Aminosäure entspricht. Wäre die Aminosäure quantitativ in einbasische ätherlösliche Säuren übergegangen, so hätte eine Vermehrung um 90 ccm  $n/1$ -Natronlauge gefunden werden müssen. Die Vermehrung betrug jedoch nur 9,4 ccm, also nicht wesentlich mehr als 10% des möglichen Ausschlags.

Dieser Verlauf sprach für eine sehr ausgiebige Verbrennung des m-Tolylalanins, er ließ jedoch trotzdem erwarten, daß sich im Harn noch nachweisbare Mengen von Abbauprodukten finden ließen.

Der mit Äther extrahierte Harn war optisch inaktiv und wurde nicht weiter untersucht.

Die restlichen 450 ccm der wässrigen Lösung des Ätherextrakts wurden wieder im Vakuum eingedampft bis zur Trockene. Der Rückstand wurde in konzentrierter Bisulfit-

lauge aufgenommen und diese mehrfach mit  $\text{SO}_2$ -haltigem Äther, der Äther wieder mit Bisulfit ausgeschüttelt.

Die Bisulfitlösung wurde mit Salzsäure bis zur kongosauren Reaktion versetzt, die schweflige Säure auf dem Wasserbad verjagt, die Lösung wieder ausgeäthert. Der Ätherextrakt bildete nach Verdampfen des Äthers nur eine geringe Menge eines nicht krystallisierenden Sirups (Menge: 0,6 g). Derselbe reduzierte weder ammoniakalische Silberlösung noch alkalische Kupferlösung und gab mit Eisenchlorid keinerlei Farbreaktion. Das Vorhandensein einer Ketonensäure in dieser Fraktion war somit auszuschließen.

Die von der Bisulfitlösung abgetrennte ätherische Lösung wurde ebenfalls nach dem Trocknen mit Glaubersalz abdestilliert. Sie hinterließ einen Sirup, der nach einigen Tagen stark mit Krystallen durchsetzt war. Durch Umkrystallisieren gelang jedoch deren Abtrennung nicht. Die Hauptmenge löste sich in heißem Benzol, unter Zurückbleiben von ganz wenig einer dunkelgefärbten harzigen Masse. Die Benzollösung war optisch inaktiv. Auch aus Benzol wurde schließlich nur wieder ein mit Krystallen durchsetzter Sirup erhalten, der nach dem Trocknen im Exsikkator 1,5 g wog. Schließlich konnten die Krystalle nur durch Abpressen auf Ton gereinigt werden, wobei allerdings die Hauptmenge des Extrakts in den Poren verschwand. Die zurückbleibenden Krystalle ließen sich dann aus Wasser umkrystallisieren und wurden daraus in weißen Nadeln erhalten. Dieselben wogen 0,06 g, waren stickstofffrei, sublimierten beim Erhitzen und schmolzen bei  $121^\circ$ , waren somit mit Benzoesäure zu identifizieren.

Aus dem Tonscherben noch krystallisierbare Stoffe zu isolieren, war nicht möglich.

Da die Benzoesäure als Abbauprodukt des Tolyalanins nicht in Betracht kommt, ist es somit nicht gelungen, im Ätherextrakt des Harns einen Abkömmling der verfütterten Substanz aufzufinden, nachdem schon die Titration gezeigt hatte, daß man nur geringe Mengen solcher erwarten konnte.

Es muß deshalb aus diesen Versuchen der Schluß gezogen werden, daß auch das m-Tolylalanin im Organismus in weitgehendem Maße der Verbrennung unterliegt, und zwar offenbar noch vollständiger als das von Dakin untersuchte p-Tolylalanin. Dieses Resultat wäre eine weitere Stütze für die Annahme, daß die Methylgruppe im Kern den Abbau des Benzolkerns nicht stört, ohne Rücksicht auf die Konstitution. Die gefundene, anscheinend besonders gute, Verbrennbarkeit gerade unserer Substanz könnte aber auch zugunsten der Annahme der Chinole als Zwischenprodukte verwendet werden.

In der nachstehenden Arbeit wird auf diese Folgerungen zurückzukommen sein.

---