

Über den Abbau des m-Methylphenylalanins im Organismus.

II. Mitteilung.

Von

K. Fromherz und L. Hermanns.

(Aus der medizinischen Poliklinik in Freiburg i. Br.)

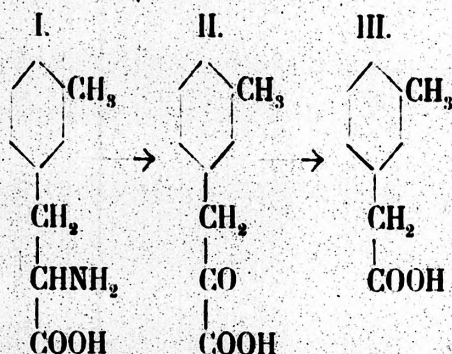
(Der Redaktion zugegangen am 6. Dezember 1913.)

Die vorstehende Arbeit von L. Böhm führte zu dem Resultat, daß das verfütterte m-Methylphenylalanin (m-Tolylalanin) gut verbrannt wird, möglicherweise sogar besser als das entsprechende p-Tolylalanin. Das Resultat befriedigte jedoch nicht völlig, weil es nicht gelang, den entsprechend der Vermehrung der ätherlöslichen Säuren sicher vorhandenen unverbrannten Anteil der Aminosäure oder ihrer Umwandlungsprodukte zu isolieren. Die schließlich nach mühsamen Versuchen aus dem Harn des Versuchstags isolierte Benzoesäure ließ die Vermutung aufkommen, daß schließlich doch ein mit Glykokoll gepaartes Umwandlungsprodukt in größerer Menge vorhanden gewesen sein könnte, das einen großen Teil des Glykokolls beansprucht und der Paarung mit Benzoesäure entzogen hätte. Ferner konnte bei der großen Wasserlöslichkeit der verfütterten Aminosäure ein in Wasser leicht und in Äther schwer lösliches Produkt im Harn ausgeschieden worden sein, das sich durch diese Eigenschaften dem Nachweis entzogen hätte.

Da es Herrn Böhm aus äußeren Gründen nicht mehr möglich war, die Arbeit fortzusetzen, suchten wir der Frage des Verbleibs, der Menge und der chemischen Natur der vermuteten Umwandlungsprodukte des m-Tolylalanins noch durch einige Versuche näher zu kommen.

Quantitative Verfolgung der Verbrennung der Aminosäure.

In erster Linie war erforderlich, mit Sicherheit festzustellen, welche Mengen an unverbrannten Abkömmlingen unserer Aminosäure im Harn vorhanden sein konnten im Vergleich zum entsprechenden p-Tolylalanin. Wir verfütterten dazu einem gleichmäßig genährten Hund gleiche Mengen der beiden Aminosäuren und bestimmten im Harn Stickstoff und Kohlenstoff. In derselben Versuchsreihe gaben wir noch zum Vergleich die dem m-Tolylalanin (I) entsprechende m-Tolylessigsäure (III), um auch deren Ausscheidung im Harn zu verfolgen. Da die letztere Säure auch ein Abbauprodukt des Tolylalanins sein konnte, wie die beigefügten Formeln veranschaulichen, war es möglich, auf diese Weise die Auffindung des Wegs zur Identifizierung eines ausgeschiedenen Paarlings zu erleichtern.



Die Resultate dieser Versuche sind zunächst in der nebenstehenden Tabelle enthalten. Der Stickstoff wurde nach Kjeldahl, der Kohlenstoff auf nassem Wege nach Messinger bestimmt, mit der alleinigen Abänderung, daß das vorgelegte Verbrennungsrohr nur mit Bleichromat gefüllt war. Der weibliche Hund wog 11,8 kg, war zwecks Erleichterung des Katheterisierens operiert und wurde täglich zur bestimmten Stunde zur Abgrenzung der Tagesmengen des Harns katheterisiert. Das Futter bestand in Milch und Hundekuchen. Der Hund wog am Ende des Versuchs noch 11,5 kg, hatte also nicht wesentlich durch den Versuch abgenommen. Die Substanzen wurden in Milch aufgeschwämmt durch die Schlundsonde gegeben. Erbrechen trat in keinem Fall ein.

Stoffwechselversuch am Hund.

I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.	IX.
Datum	Urinmenge ccm	Spez. Gew.	Urinmenge mit Spül- flüssigkeit ccm	N %	N pro die g	C %	C pro die g	C:N %
1913								
I. 28./29. X.	400	1025	500	1,324	6,62	1,042	5,21	0,787
II. 29./30.	190	1032	400	1,235	4,94	0,952	3,81	0,770
III. 30./31.	500	1021	700	0,854	5,98	0,677	4,74	0,790
IV. 31.X./1.XI.	1050	1017	1200	0,468	5,51	0,799	9,59	1,719
V. 1./2.	270	1021	400	1,288	5,15	1,105	4,42	0,839
VI. 2./3.	550	1014	700	0,682	4,77	0,619	4,33	0,908
VII. 3./4.	700	1015	1000	0,524	5,24	0,615	6,15	1,170
VIII. 4./5.	360	1024	600	0,904	5,43	0,867	5,26	0,964
IX. 5./6.	1100	1016	1200	0,941	{	0,822	{	4,91
6./7.				5,65				
X. 7./8.	950	1012	1200	0,542	6,50	0,615	7,38	1,140
XI. 8./9.	340	1029	500	1,196	5,98	1,054	5,27	0,881
XII. 9./10.	(1620)	1013	1620	0,750	{	0,662	{	5,36
10./11.				6,08				

 31. X. 10^h a. m. 4 g m-Tolylessigsäure
 3^h p. m. 2 „

 3. XI. 11^h a. m. 4 g m-Tolyalanin
 3^h p. m. 3 „

 7. XI. 11^h a. m. 7 g p-Tolyalanin

Zunächst wurden 6,0 g m-Tolylessigsäure mit Natriumbicarbonat neutralisiert gegeben. Aus den Zahlen der Tabelle geht unter Berücksichtigung des Verhältnisses C:N der Normalperioden ohne weiteres hervor, daß am Versuchstag sogar mehr Kohlenstoff vermehrt ausgeschieden wurde, als der eingeführten Säure entsprach. Die Säure muß also wenigstens zum großen Teil gepaart ausgeschieden worden sein. Nimmt man eine Paarung mit Glykokoll an, dann ist nach den Bestimmungen 93% der eingeführten Substanz wieder im Harn erschienen, das ist also für physiologische Verhältnisse eine so gut wie quantitative Ausscheidung.

Zur Bestimmung der ätherlöslichen Säuren wurden die Harne der Normalperioden vereinigt. Die auf den Tag berechnete Menge derselben, angegeben in Kubikzentimetern $n/1$ -Natronlauge, betrug in der Vorperiode 5,4 ccm, am Versuchstag mit m-Tolylessigsäure 41,9 ccm, das bedeutet also eine Vermehrung um 36,5 ccm. Da 6,0 g der verfütterten Säure 40,0 ccm verbraucht hätten, entsprach also die Vermehrung der ätherlöslichen Säuren 91% der verfütterten Substanz, ein Resultat, das mit dem Ergebnis der Kohlenstoffbestimmungen im Harn sehr gut übereinstimmt. Das ausgeschiedene Umwandlungsprodukt war also quantitativ mit Äther zu extrahieren. Auf die chemische Natur desselben wird unten zurückzukommen sein.

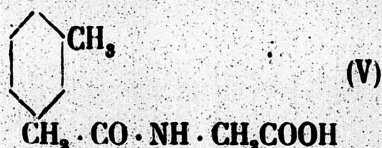
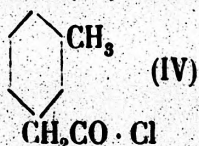
Am siebenten Tag der Tabelle wurden 7,0 g m-Tolylalanin, also die etwa äquimolekulare Menge wie beim ersten Versuch gegeben. Der Kohlenstoff stieg an diesem Tag bei weitem nicht so hoch wie bei der Tolylessigsäure, wenn auch immerhin ein sehr deutlicher Anstieg festzustellen ist. Aus dem Verhältnis C : N läßt sich berechnen, daß etwa 35%, also immerhin über ein Drittel des Kohlenstoffs der verfütterten Aminosäure in den Harn übergegangen ist. Die Verbrennung ist also keine vollständige, obwohl ein wesentlicher Teil zu den letzten Endprodukten abgebaut wird. Vergleicht man dieses Resultat mit dem von Böhm durch Bestimmung der ätherlöslichen Säuren gewonnenen, wobei nur 10% als unverbrannt nachzuweisen waren, so ergibt sich, daß die Hauptmenge des unverbrannt ausgeschiedenen Restes der Aminosäure sich nicht

durch Äther aus dem Harn extrahieren läßt, demnach bei der Untersuchung des Harns leicht entgeht.

Am zehnten Tage der Tabellen wurde in derselben Weise das schon von Dakin gegebene p-Tolylalanin verfüttert. Der Kohlenstoff zeigte genau dasselbe Verhalten wie bei der Meta-Verbindung. Es wurde sogar ziemlich genau derselbe Anteil, 35%, unverbrannt ausgeschieden, die Substanz war also in gleichem Grade der Verbrennung zugänglich.

Darstellung der m-Tolylacetursäure:

Die Isolierung der Umwandlungsprodukte suchten wir zunächst durch die Synthese des einen vermuteten zu erleichtern. Da anzunehmen war, daß die Tolylessigsäure im Harn mit Glykokoll gepaart erscheint, haben wir diesen Paarling synthetisch dargestellt. Durch Überführung von m-Tolyllessigsäure in das Chlorid (IV.) und Kondensation dieses Chlorids mit Glykokoll nach Schotten-Baumann ist leicht die m-Tolylacetursäure (V.) zu erhalten.



1. m-Tolylacetylchlorid: 20,0 m-Tolyllessigsäure (von Schuchardt) wurden mit 60,0 Thionylchlorid übergossen und zwei Stunden auf dem Wasserbad am Rückflußkühler erhitzt. Die Säure löst sich sehr rasch, eine nennenswerte Verfärbung tritt nicht ein. Das Reaktionsgemisch wird sofort der fraktionierten Destillation unter vermindertem Druck unterworfen, wobei das reine m-Tolylacetylchlorid bei 15 mm und 136° übergeht. Es ist ein Öl von mäßig stechendem Geruch. Ausbeute 70—80% der Theorie.

0,1416 g Substanz gaben 0,1194 g AgCl:

C_9H_9OCl berechnet: Cl = 21,09%

gefunden: Cl = 20,83%

2. m-Tolylacetylglykokoll (m-Tolylacetursäure): Zu 5,0 g Glykokoll, gelöst in 300 Wasser und versetzt mit 30,0 Natriumbicarbonat, werden im Schütteltrichter im Lauf einer Stunde unter ständigem Umschütteln allmählich 10,0 g

m-Tolylacetylchlorid zugetropft. Man wartet mit dem weiteren Zusatz jeweils bis zum Verschwinden des Geruchs des Chlorids. Wenn alles Chlorid zugesetzt und verbraucht ist, schüttelt man noch 10 Minuten und säuert dann mit Salzsäure stark an. Es fällt sofort eine schmierige und beim Stehen über Nacht eine krystallinische Masse aus, die zusammen abgesaugt und getrocknet werden. Nach dem Trocknen wird 1- bis 2 mal mit Petroläther ausgekocht, worin die m-Tolylessigsäure spielend löslich ist. Der Rückstand wird abgesaugt, mit Petroläther gewaschen und getrocknet, dann aus Wasser umkrystallisiert: Ausbeute 7 g.

Die m-Tolylacetursäure krystallisiert aus heißem Wasser (10fache Menge) in farblosen prismatischen und wetzsteinförmigen Krystallen, die bei langsamer Krystallisation manchmal zu Blättchen verwachsen. Sie schmilzt bei 149° , löst sich leicht in heißem, schwer in kaltem Wasser und in Äther, etwas leichter in Essigäther, ist unlöslich in Ligroin und Petroläther.

1. 0,3575 g Substanz heiß gelöst und titriert mit Phenolphthalein als Indikator verbrauchen 17,0 ccm n_{10} -NaOH:

Molekulargewicht, einbasische Säure angenommen:

gefunden: 210,3%

$C_{11}H_{13}NO_3$ berechnet: 207,1%

Dieselbe Menge zur N-Bestimmung nach Kjeldahl verwendet verbraucht 17,2 ccm n_{10} -NaOH:

2. 0,1554 g Substanz gaben 0,3645 g CO_2 und 0,0978 g H_2O :
 $C_{11}H_{13}NO_3$ berechnet: C = 63,76%; H = 6,34%; N = 6,76%
 gefunden: 1. — — — N = 6,74%

2. C = 63,96%; H = 6,94%; —

Eine heiße 1%ige wässrige Lösung der m-Tolylacetursäure scheidet beim Erkalten eine reichliche Menge Krystalle ab. Die bei Zimmertemperatur gesättigte Lösung enthält 0,34% der Säure. Schüttelt man diese Lösung mit dem gleichen Volumen Äther aus, dann geht etwas mehr als die Hälfte der Säure in den Äther, worin also die Löslichkeit nur wenig besser ist als in Wasser.

Aus diesen Eigenschaften der Substanz geht hervor, daß dieselbe aus dem Harn durch Ätherextraktion leicht darstellbar sein müßte.

säure wird ebenso wie die Phenyllessigsäure einfach mit Glykokoll gepaart ausgeschieden. Es sind jedoch im Harn dieser in reinem Zustand schön krystallisierenden Säure andere, schmierige Stoffe beigemengt, vielleicht auch ungepaarte Tolylessigsäure, die die Krystallisation hemmen und der Isolierung der Acetursäure große Schwierigkeiten bereiten.

Nach diesen Erfahrungen erscheint es durchaus erklärlich, daß es bei den Versuchen von Herrn Böhm in der vorangehenden Arbeit, für die der eine von uns mit verantwortlich ist, nicht gelang, geringe vorhandene Mengen m-Tolylacetursäure zu isolieren. Da eine Ketonsäure nicht entstanden war, alle andern möglichen Umwandlungsprodukte eines substituierten Phenylalanins aber optisch aktiv sein müßten, die von Herrn Böhm unter Kontrolle des einen von uns gewonnenen Fraktionen aus dem Harn nach Verfütterung des m-Tolylalanins alle optisch inaktiv waren, muß die mit Glykokoll gepaarte m-Tolyllessigsäure als dasjenige Produkt angesehen werden, das die Vermehrung der ätherlöslichen Säuren und des Harnkohlenstoffs nach den Gaben von m-Tolylalanin verursacht. Dieses Umwandlungsprodukt nun wirklich aus dem m-Tolylalaninharn zu isolieren, wurde aufgegeben, weil das Interesse solcher Versuche der aufzuwendenden Mühe nicht entsprechen würde.

Schlußfolgerungen.

Aus den Versuchen von Böhm und uns geht hervor, daß das m-Tolylalanin wie das p-Tolylalanin in gleicher Weise zu rund $\frac{2}{3}$ der verfütterten Menge verbrannt werden.

Dieses Resultat ist einigermaßen überraschend. Nach den Ausführungen in der Einleitung zur vorangehenden Arbeit wäre zu erwarten gewesen, daß die m-Verbindung, leichter verbrannt

wird, weil sie in p-Stellung nicht substituiert ist. Denn dort soll nach den Annahmen Neubauers der Benzolkern zuerst im Organismus oxydiert werden.

Man könnte aus unsern Resultaten deshalb den Schluß ziehen, das im Gegensatz zu Neubauers Theorie der erste Angriffspunkt der Oxydation am Benzolkern ein beliebiger ist. Dem stehen aber doch die Befunde bei den drei isomeren Tyrosinen entgegen, von denen das natürliche p-Tyrosin glatt verbrannt wird, während die o- und m-Verbindungen nach Blum und Flatow zu wesentlichen Teilen unverbrannt ausgeschieden werden. Wir möchten deshalb nur folgern, daß der erste Angriffspunkt auch ein anderer als das p-Wasserstoffatom sein kann, wenn ein solcher Abbaumodus auch ein Hilfsmittel zweiter Ordnung und deshalb wesentlich unvollkommener ist als der bevorzugte. Für das m-Tolylalanin müssen wir annehmen, daß auch das neben dem p-Wasserstoffatom stehende Methyl, nicht nur das dieses substituierende wie bei dem Dakinschen p-Methylphenylalanin, die Oxydation in p-Stellung, die zu dem normalen, bevorzugten Abbau führt, hemmt.

Wir haben im Hinblick darauf unsere Versuche fortgesetzt und werden demnächst über dieselben weiter berichten.

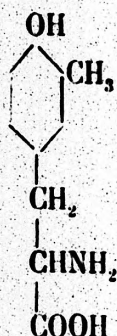
Ein Einwand könnte unsern Versuchen noch gemacht werden, daß nämlich die Resorption im Darm eine unvollständige sein könnte. So schwierig es ist, diesen Einwand exakt zu entkräften, so halten wir ihn doch für ganz unberechtigt, weil nicht angenommen werden kann, daß eine zumal in den Säften des Darmkanals sich spielend lösende Aminosäure nicht auch ebensoleicht aus dem Darm resorbiert werden sollte.

Anmerkung.

Wir haben die beiden Tolylalanine (mit dem einen die Versuche Dakins nachprüfend) auch an einen Alkaptonuriker verfüttert und festgestellt, daß beide nicht in Alkapton übergehen.

(H : N : Vortag: 52,9, — m-Tolylalanintag (16 g) 44,0. — Nachttag: 54,6).

Ferner haben wir das m-Methyltyrosin dargestellt, ausgehend vom 3-Methyl-4-Methoxy-benzaldehyd:



F. P. 277°. I. 0,1737 g Substanz gaben 0,3940 g CO₂ und 0,1065 g H₂O

H. 0,2332 g Substanz gaben 15,25 ccm N bei 22° u. 745,5 mm

C₁₀H₁₃NO₂ berechnet: C = 61,51%; H = 6,71%; N = 7,17%.

gefunden: I. C = 61,86%; H = 6,79%; II. N = 7,20%.

Auch diese Substanz geht beim Alkaptonuriker nicht in ein Hydrochinonderivat über (H : N: Vortag: 49,3 — nach m-Methyltyrosin (8 g) : 52,4 — Nachtag: 50,8).

Trotzdem wird sie vom Alkaptonuriker glatt verbrannt ausweislich des Kohlenstoffgehalts des Harns: (C : N: Vortag: 1,005. — Versuchstag: 0,980. — Nachtag: 1,023).

Zur Kontrolle verfütterte p-Oxyphenylbrenztraubensäure ging nur zu 1/3 in Homogentisinsäure über, der Rest wurde ausweislich der Kohlenstoffbestimmungen verbrannt.

Der Alkaptonuriker ist also imstande, alle diese aromatischen Substanzen zu verbrennen.

Auf diese Versuche werden wir demnächst zusammen mit noch nicht völlig abgeschlossenen ausführlich zurückkommen.