

## 150. Isolierung von (–)-Phenyl-milchsäure und Phenyl-brenztraubensäure aus Menschenharn bei Imbecillitas phenylpyruvica<sup>1)</sup>

von E. A. Zeller.

(29. VI. 43)

Phenyl-milchsäure ist schon mehrmals in der belebten Natur aufgefunden worden. Verschiedene Bakterien vermögen Phenylalanin zu Phenyl-milchsäure abzubauen; so bilden *Oidium lactis*<sup>2)</sup> und *B. proteus*<sup>3)</sup> aus *d,l*-Phenylalanin die rechtsdrehende, *B. subtilis* die linksdrehende Phenyl-milchsäure<sup>3)</sup>. Im menschlichen und tierischen Organismus wird die in grösseren Mengen verabreichte Phenyl-brenztraubensäure in die linksdrehende Form umgewandelt<sup>4)</sup>.

Umgekehrt kann die Ratte Phenyl-milchsäure zu Phenylalanin aminieren, da die Oxysäure die entsprechende „lebensnotwendige“ Aminosäure vollständig ersetzen kann<sup>5)</sup>. Bei Patienten, die an einer besonderen Form des Schwachsinn leiden, die mit einer Stoffwechselstörung, der Ausscheidung von Phenyl-brenztraubensäure verbunden ist (Imbecillitas phenylpyruvica<sup>6)</sup>), nimmt nach Belastung mit Phenyl-milchsäure der Phenylalanin Gehalt des Blutes zu<sup>7)</sup>. Mit Deuterium markierte *d,l*-Phenyl-milchsäure fand sich in der Ratte nach kurzer Zeit als Tyrosin wieder<sup>8)</sup>.

Phenyl-milchsäure scheint somit eine mögliche Zwischenstufe im Auf- und Abbau des Phenylalanins zu sein, wurde aber als spontan gebildeter Stoff im tierischen und menschlichen Organismus bis jetzt nicht aufgefunden. Ihr Schicksal im tierischen Organismus wird deshalb im Handbuch für normale und pathologische Physiologie bei den körperfremden Substanzen abgehandelt<sup>9)</sup>. Allerdings hatte *Fölling*, der Entdecker der erwähnten, mit Schwachsinn einhergehenden Stoffwechselanomalie<sup>10)</sup>, im Harn dieser Patienten neben Phenyl-brenztraubensäure noch eine weitere Säure aufgefunden, von der er, weil sie durch Rattennierenextrakt abgebaut wurde, vermutete, dass es

<sup>1)</sup> Die vorliegenden Ergebnisse wurden an der 23. Tagung des Schweizerischen Vereins der Physiologen und Pharmakologen am 3. Juli 1943 mitgeteilt.

<sup>2)</sup> *F. Ehrlich* und *K. A. Jacobson*, *B.* **44**, 888 (1911).

<sup>3)</sup> *H. Amatsu* und *M. Tsudji*, *Acta Schol. Med. Univ. Imp. Kyoto* **2**, 447 (1917/18); zit. nach *T. Sasaki* und *J. Otsuka*, *Bioch. Z.* **121**, 167 (1921).

<sup>4)</sup> *Y. Kotake*, *Z. physiol. Ch.* **122**, 241 (1922).

<sup>5)</sup> *W. C. Rose*, *Science* **86**, 298 (1937).

<sup>6)</sup> *A. Fölling*, *Z. physiol. Ch.* **227**, 169 (1934).

<sup>7)</sup> *G. A. Jervis*, *R. Y. Block*, *D. Bolling* und *E. Kanze*, *J. Biol. Chem.* **134**, 105 (1940).

<sup>8)</sup> *A. R. Moss*, *J. Biol. Chem.* **137**, 739 (1941).

<sup>9)</sup> Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie **5**, 1024 (1928).

<sup>10)</sup> *A. Fölling*, l. c.

sich um die Phenyl-milchsäure handle, und dass sie sekundär, etwa durch freiwilligen Zerfall beim Stehen aus Phenyl-brenztraubensäure entstehe<sup>1)</sup>).

Bei gemeinsam mit *C. Brugger* durchgeführten und noch nicht abgeschlossenen Untersuchungen, über die später berichtet werden soll<sup>2)</sup>, über den Stoffwechsel von zwei von *C. Brugger* entdeckten Geschwisterkindern<sup>3)</sup> mit Imbecillitas phenylpyruvica wurde der Harn derselben regelmässig auf Phenyl-brenztraubensäure untersucht, deren Anwesenheit durch die intensive Grünfärbung, die dieser Stoff mit  $\text{Fe}^{+++}$  gibt, leicht nachgewiesen werden kann. Mehrere Male wurde die Phenyl-brenztraubensäure präparativ aus den Harnen dargestellt und mit synthetisch hergestellten Produkten identifiziert. Kleinere Mengen wurden als Phenylhydrazon erfasst. Mit der entwickelten Methode können nun wenige Milligramme der Ketonensäure pro Liter aus Harn präparativ isoliert werden. Da es auch Stoffwechselstörungen gibt, bei denen p-Oxyphenyl-brenztraubensäure ausgeschieden wird (Tyrosinosis<sup>4)</sup>, Vitamin C-Mangel bei Meerschweinchen<sup>5)</sup>, früh geborenen Kindern<sup>6)</sup>), die ebenfalls mit  $\text{Fe}^{+++}$  eine intensive Grünfärbung ergibt, so ist diese präparative Sicherstellung der gewöhnlich nur kolorimetrisch bestimmten Ketonensäuren von Vorteil. Bei der Fraktionierung der Säuren, die bei kongosaurer Reaktion aus wässriger in ätherische Lösung übergehen, wurde neben der Phenyl-brenztraubensäure eine Substanz gefunden, die mit  $\text{Fe}^{+++}$  keine Grünfärbung, wohl aber eine Gelbfärbung, und mit Dinitro-phenylhydrazin keine Fällung gab. Die Substanz war optisch aktiv und konnte aus Äther/Benzol rein in Form von farblosen, wohlausgebildeten nadelförmigen Prismen gewonnen werden. Nach Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt, Analyse, Mikrotitration, Drehung und allen übrigen untersuchten Eigenschaften erwies sie sich als die linksdrehende (—)- $\alpha$ -Oxy- $\beta$ -phenylpropionsäure, die damit zum ersten Male bei einem Vertreter der höhern Organismen als spontan gebildeter und ausgeschiedener Stoff isoliert worden ist. Da es sich um die (—)-Phenyl-milchsäure handelt, kann diese nur enzymatisch entstanden sein. Die Art der Gewinnung

<sup>1)</sup> *K. Closs* und *A. Fölling*, *Z. physiol. Ch.* **254**, 250 (1938).

<sup>2)</sup> Von den bisherigen Ergebnissen sei erwähnt, dass die Ausscheidung von Phenyl-brenztraubensäure bei Imbecillitas phenylpyruvica durch Vitamin  $\text{B}_6$  beeinflusst zu werden scheint. Der mit  $\text{Fe}^{+++}$  und Phenyl-brenztraubensäure gebildete grüne Farbstoff ergibt das gleiche Absorptionsspektrum bei saurer, neutraler und alkalischer Reaktion und im reduzierten Zustand wie die von *S. Lepkovsky* und *E. Nielsen* (*J. Biol. Ch.* **144**, 135 (1942)) im Harn von  $\text{B}_6$ -Mangelratten und von *P. J. Fouts* und *S. Lepkovsky* (*Proc. Soc. exptl. Biol. Med.* **50**, 221 (1942)) im Harn von  $\text{B}_6$ -Mangelhunden gefundene Substanz, die mit  $\text{Fe}^{+++}$  ebenfalls einen grünen Farbstoff bildet.

<sup>3)</sup> *C. Brugger*, *Schweiz. Arch. Neurol. Psychiat.* **49**, 62 (1942).

<sup>4)</sup> *G. Medes*, *Biochem. J.* **26**, 917 (1932).

<sup>5)</sup> *R. R. Sealock*, *J. D. Perkinson jr.* und *D. H. Basinski*, *J. Biol. Chem.* **140**, 153 (1941).

<sup>6)</sup> *S. Z. Levine*, *E. Marples* und *H. H. Gordon*, *Science* **90**, 620 (1939).

des Harnes (vgl. experimenteller Teil) schliesst eine bakterielle Genese sicher aus.

Ich danke Herrn Prof. Dr. *T. Reichstein* für die mannigfache Unterstützung dieser Arbeit.

### Experimentelles.

Alle Schmelzpunkte wurden auf *Kofler*-Block bestimmt und korrigiert.

#### (—)-Phenyl-milchsäure aus Menschenharn.

Der frische Harn (400—800 cm<sup>3</sup>) wurde sofort nach Entleerung mit Salzsäure kongosauer gemacht, mit alkoholischem Thymol stabilisiert und nach spätestens 1—3 Stunden im Extraktor mit Äther einige Stunden extrahiert. Nach vier- bis fünfmaliger Ausschüttelung der ätherischen Lösung mit verdünnter Sodalösung wurde die wässrige Phase wegen der grossen Zersetzlichkeit der Phenyl-brenztraubensäure bei alkalischer Reaktion jedesmal sofort mit Salzsäure bis zur Bläuung von Kongorot versetzt. Die vereinigten wässrigen Lösungen wurden 4—5 mal mit total ca. 400 cm<sup>3</sup> Äther ausgeschüttelt, die vereinigten ätherischen Lösungen 2 mal mit je 1—2 cm<sup>3</sup> konz. Salzsäure geschüttelt, wobei sich die Säure leuchtend rot färbte, und dann noch 2 mal mit je 1—2 cm<sup>3</sup> Wasser. Nach der Trocknung mit Natriumsulfat wurde das verbleibende, dunkelbraun gefärbte Öl in wenig Äther gelöst, wobei im allgemeinen in Äther schwer lösliche, farblose Krystalle auftreten, die nach Umkrystallisieren aus Aceton/Äther bei 192,5—193° schmelzen. Etwas unterhalb 190° tritt eine starke Sublimation der Substanz auf, und die am Deckglas sich bildenden wasserhellen Tröpfchen krystallisieren als feine Nadeln aus. Mit einer synthetischen Probe von Hippursäure (*Hoffmann-La Roche*), die bei 193,5—194° schmolz, tritt keine Schmelzpunktserniedrigung ein (191,5—194,5°).

Der nicht krystallisierte Teil wurde im Molekularkolben bei ca. 0,01 mm Hg destilliert. Anfänglich wurde fraktioniert destilliert mit Fraktionen bis 70°, 100°, 120° und 140°. Später wurde einfach bis zu 100—120° Badetemperatur erwärmt. Sowohl die Phenyl-brenztrauben- als die Phenyl-milchsäure beginnen schon bei 70° Badetemperatur sich am Kühlstift abzuschcheiden.

Das Destillat wird in Äther aufgenommen und der Äther etwas eingeengt, wobei sich gewöhnlich noch etwas Hippursäure ausscheidet. Dann wird mit Benzol versetzt und der Äther teilweise vertrieben. Auch jetzt bilden sich gelegentlich noch kleine Krystallisate, die vorwiegend aus Hippursäure zusammengesetzt sind. Nach Entfernung derselben setzt bei weiterem Zusatz von Benzol und nach stärkerer Abdampfung des Äthers nach einigen Stunden Stehen bei Zimmertemperatur Krystallisation in schönen, farblosen, nadelförmigen Prismen ein. In mehreren Fällen gaben sie mit Fe<sup>+++</sup> keine Grünfärbung, enthielten somit keine Phenyl-brenztraubensäure, in andern Fällen dage-

gen war die Ketonsäure noch nachzuweisen. Durch ein- bis zweimaliges Umkrystallisieren aus Äther/Benzol und Waschen mit Benzol können die Krystalle leicht völlig rein gewonnen werden und schmelzen bei 125°. Mit Fe<sup>+++</sup> (Eisen(III)-ammoniumsulfat) geben sie schon in winzigen Spuren eine grünstichige Gelbfärbung. Die spezifische Drehung beträgt:  $[\alpha]_D^{18} = -22,1^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1,2206$  in Aceton).

12,2 mg Subst. zu 0,9994 cm<sup>3</sup>;  $l = 1$  dm;  $\alpha_D^{18} = -0,27^\circ \pm 0,02^\circ$ .

3,436 mg Subst. gaben 8,169 mg CO<sub>2</sub> und 1,850 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub> (166,17) Ber. C 65,05 H 6,07%

Gef. „ 64,88 „ 6,02%

4,920 mg Subst. in 10 cm<sup>3</sup> Alkohol gelöst und heiss titriert verbrauchten 3,030 cm<sup>3</sup> 0,01-n. Kalilauge.

Äquiv.-Gew. Ber. 166,17 Gef. 162,4.

Aus *l*-(—)-Phenyl-alanin (*Hoffmann-La Roche*) wurde durch Einwirkung von salpetriger Säure genau nach der Vorschrift von *Dakin* und *Dudley*<sup>1)</sup> Phenyl-milchsäure dargestellt, die wie die präparativ gewonnene aus Äther/Benzol 2 mal umkrystallisiert wurde. Sie schmolz bei 125,5° und gab mit einem aus Harn gewonnenen Präparat vom Smp. 124,5—126,5° einen Mischschmelzpunkt von 124,5 bis 125,5°. (Die racemische Phenyl-milchsäure schmilzt bei 98°.) Die spezifische Drehung betrug:  $[\alpha]_D^{14} = -26,9^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1,374$  in Aceton.)

34,365 mg Subst. zu 2,501 cm<sup>3</sup>;  $l = 1$  dm;  $\alpha_D^{14} = -0,37^\circ \pm 0,02^\circ$ .

#### Phenyl-brenztraubensäure und Phenyl-brenztraubensäure-phenylhydrazon aus Menschenharn.

Wenn die Mutterlauge aus Phenyl-milchsäure weiter mit Benzol versetzt wird, treten Krystallfraktionen auf, die entweder schon reine Phenyl-brenztraubensäure darstellen, oder aber noch Phenyl-milchsäure enthalten. Schliesslich kommt man zu reinem Ketonsäurefraktionen, die mit Benzol gewaschen werden. Sie werden aus farblosen, sechs- und dreieckigen zarten Krystallblättchen gebildet, die eine sehr starke Grünfärbung mit Fe<sup>+++</sup> geben. Sie schmelzen im Bereich von 155—163°, unreine Fraktionen natürlich noch tiefer. Mit synthetisch hergestelltem Produkt ergab sich keine Schmelzpunktserniedrigung. Phenyl-brenztraubensäurekrystalle gelten als nicht haltbar. Nach wenigen Tagen oder Wochen zerfließen sie und riechen stark nach bittern Mandeln. Im Hochvakuum eingeschlossen hielten sie sich aber bisher mehrere Monate lang.

Die Synthese der Phenyl-brenztraubensäure wurde über den Phenyl-oxalessigester vollzogen<sup>2)</sup>. Dieser wurde unter 0,02 mm Hg destilliert und ging bei 125—133° über. Seine Zersetzung zur Keton-säure geschah mit 2-n. Salzsäure am Rückfluss, Badetemperatur 160°.

<sup>1)</sup> *H. D. Dakin* und *H. W. Dudley*, *J. Biol. Chem.* **18**, 29 (1914).

<sup>2)</sup> *W. Wislicenus*, *B.* **20**, 589 (1887).

Die Zersetzung wurde durch Auffangen des gebildeten Kohlendioxyds bzw. der von diesem verdrängten Luft kontrolliert und war nach 3—3½ Stunden beendet. Nach der Zerlegung wurde die Ketonsäure mit Äther aufgenommen und im Vakuum (0,06 mm Hg) im Molekular- kolben bis zu 110° destilliert. Umkrystallisieren aus Äther/Chloro- form gab Blättchen vom Smp. 157—163°.

Bei der Zerlegung der  $\alpha$ -Acetamino-zimtsäure durch Salzsäure zu Phenyl-brenztraubensäure<sup>1)</sup> ergaben sich grössere Ausbeuten. Zum Umkrystallisieren diente Äther/Benzol.

Phenyl-brenztraubensäure kann präparativ auch aus reinen Lösungen nicht annähernd quantitativ isoliert werden. Es braucht relativ grosse Mengen im Harn, um die Krystalle zu erhalten. In den Mutterlaugen, die nach der oben beschriebenen Isolierung der Phenyl- brenztraubensäure aus Harn anfallen, finden sich, wie die Fe-... Reaktion anzeigt, noch erhebliche Mengen an Ketonsäure. Um auch wenige Milligramm pro Liter Harn noch präparativ erfassen zu können, wird diese in ihr Phenylhydrazon umgewandelt.

Dazu wurde die Mutterlauge der Phenyl-milchsäure durch Ab- saugen von Äther und Benzol befreit und der Rückstand in der eben nötigen Menge Wasser aufgenommen. Dann wurde mit 1,5—2 Mol Phenylhydrazin, das mit ein paar Tropfen Eisessig in wässrige Lösung gebracht wird, versetzt, wobei sich sofort ein hell- bis orange gelber Niederschlag absetzte, der nach 15—30 Minuten auf dem *Willstätter*- Knopf abgesaugt und mit wenig Wasser gewaschen wurde. Nach völliger Trocknung im Exsikkator wurde in Äther gelöst, mit Petrol- äther versetzt und vorsichtig eingeengt. Nach Stehen über Nacht bildeten sich schöne, gelbrote prismatische Kryställchen, besonders stark an den Stellen, an denen gekratzt wurde. Sie wurden mit Petroläther gewaschen und schmolzen bei 169°. Die Krystalle können sogar unzersetzt im Molekularkolben sublimiert werden (130—140° Badetemperatur) und besitzen dann gewöhnlich einen noch höheren Schmelzpunkt (bis 173°). Nach *E. Erlenmeyer*<sup>2)</sup> schmilzt das Phenyl- hydrazon bei 160—161°.

Zur Analyse wurde eine Stunde im Hochvakuum bei 70—75° getrocknet (0,07 mm Hg).

3,895 mg Subst. gaben 10,087 mg CO<sub>2</sub> und 1,940 mg H<sub>2</sub>O

3,111 mg Subst. gaben 0,304 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (16°, 731 mm)

C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub> (254,31) Ber. C 70,85    H 5,55    N 11,02%

Gef. „ 70,68    „ 5,57    „ 11,10%

Die Mikroanalysen wurden im mikroanalytischen Laboratorium der Eidg. Tech- nischen Hochschule, Zürich (Leitung *H. Gubser*), ausgeführt.

Pharmazeutische Anstalt der Universität Basel.

<sup>1)</sup> *R. M. Herbst* und *D. Shemin*, *Organic Synth.* **19**, 77 (1939).

<sup>2)</sup> *E. Erlenmeyer*, *A.* **271**, 137 (1892).