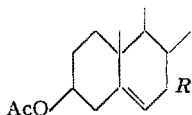
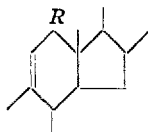
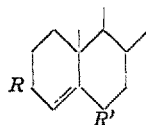
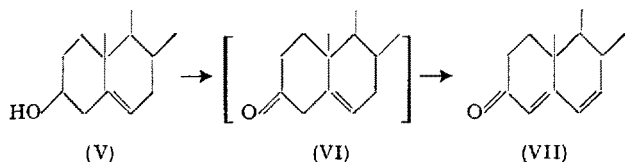
(Ia):  $R = -OH$ (Ib):  $R = =O$ (IIa):  $R = \cdots OH$ (IIb):  $R = =O$ (IIIa):  $R = \sim OH$ (IIIb):  $R = =O$ (IVa):  $R = R' = -OH$ (IVb):  $R = =O; R' = -OH$ (IVc):  $R = R' = =O$ 

(m.p. 253–256°,  $[\alpha]^{20}_D + 144^\circ$ ,  $\lambda_{max}^{EtOH}$  240 and 284 m $\mu$ ,  $\log \epsilon$  4.21 and 4.53 respectively, found: C, 81.58; H, 8.69),  $\Delta^4$ : $^6$ -pregnadien-17 $\alpha$ -ol-3,20-dione<sup>1</sup> (m.p. 240–242°,  $[\alpha]^{20}_D + 21^\circ$ ,  $\lambda_{max}^{EtOH}$  284 m $\mu$ ,  $\log \epsilon$  4.53, found: C, 77.13; H, 8.77),  $\Delta^4$ : $^6$ -pregnadien-21-ol-3,20-dione 21-acetate and  $\Delta^4$ : $^6$ -pregnadien-17 $\alpha$ ,21-diol-3,20-dione 21-acetate (6-dehydro Substance S acetate<sup>1</sup>) (m.p. 218–220°,  $[\alpha]^{20}_D + 104^\circ$ ,  $\lambda_{max}^{EtOH}$  284 m $\mu$ ,  $\log \epsilon$  4.48, found: C, 71.64; H, 8.15). This method for converting V to VII is similar to that of WETTSTEIN<sup>2</sup>. In common with the latter method it appears to proceed via the  $\Delta^5$ -3-one (VI), for when such a compound ( $\Delta^5$ -pregnene-3:20-dione) was treated with manganese dioxide at room temperature, the corresponding  $\Delta^4$ : $^6$ -dien-3-one (VII) was produced smoothly. The present method, although it appears to give yields similar to those obtained by the WETTSTEIN procedure, has the advantage that no D-homo rearrangement occurs with 17 $\alpha$ -hydroxy-20-ketones, and that saturated hydroxyl groups elsewhere in the molecule do not have to be protected.



Further applications of the above described types of oxidation are being studied in these laboratories.

F. SONDHEIMER and G. ROSENKRANZ

Research Laboratories, Syntex, S.A., Laguna Mayran 413, Mexico D. F., November 15, 1952.

### Zusammenfassung

Die Oxydation gewisser Allylalkohole in der Reihe der Steroide mit  $MnO_2$  liefert bei Zimmertemperatur die entsprechenden  $\alpha$ , $\beta$ -ungesättigten Ketone bzw. Aldehyde.  $\Delta^4$ -3 $\beta$ , 6 $\beta$ -Dirole werden bei Zimmertemperatur nur an C-3 angegriffen, womit eine bequeme Methode zur Darstellung der interessanten  $\Delta^4$ : $^6$ -hydroxy-3-Ketone gegeben ist.

Gesättigte Alkohole reagieren in der Kälte nicht. Daraus ergibt sich eine neue Synthese des Testosterons in 90prozentiger Ausbeute, ausgehend von  $\Delta^4$ -Androsten-3, 17-dion: Reduktion dieser Verbindung mit  $LiAlH_4$  und  $MnO_2$ -Oxydation des entstandenen Diolgemisches.  $MnO_2$ -Oxydation von  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hydroxy Steroiden, vorzugsweise unter Erwärmung, liefert  $\Delta^4$ : $^6$ -Dien-3-Ketone.

<sup>1</sup> That no D-homo rearrangement had occurred was indicated by the fact that 17 $\alpha$ -hydroxy-20-ones were unaffected when subjected to the conditions employed for the preparation of this substance.

<sup>2</sup> A. WETTSTEIN, *Helv. chim. Acta* 23, 388 (1940).

### Über die Struktur der nativen D-Polyglutaminsäure

Die Konstitutionsfrage der nativen D-Polyglutaminsäure, die in einheitlichem Zustand zuerst von IVÁNOVICS und BRUCKNER<sup>1</sup> isoliert wurde, ist noch umstritten. Bewiesen ist nur, dass die D-Polyglutaminsäure beider Herkunft, nämlich aus der Kapsel der Milzbrandbazillen und aus dem Nährboden der Bac.-subtilis-Gruppe angehörenden Sporenträger, ein vollständig aus Glutaminsäure-Resten aufgebautes Polypeptid darstellt<sup>2</sup>, wie dies schon früher angenommen wurde<sup>3</sup>. Umstritten blieb noch die Frage, ob die Glutaminsäure in Form von  $\alpha$ -Glutamyl- (IV) oder  $\gamma$ -Glutamyl-Resten in das Polypeptid eingebaut ist<sup>4</sup>. Besonders eingehend erörterten diese Frage HANBY und RYDON<sup>5</sup> und kamen zum Schluss, dass aus der Milzbrandbazillen-Kapsel gewonnene Präparate verhältnismässig kleineren Molgewichtes (zum Beispiel 6000) nur  $\alpha$ -Glutamyl-Bindungen (IV) enthalten können, während in Präparaten höhern Molgewichtes stellenweise, jedoch in untergeordneter Masse, auch  $\gamma$ -Glutamylketten (I) eingebaut sein können.

Wir haben vor kurzem gezeigt<sup>6</sup>, dass der Curtiusche Abbau und eine darauffolgende saure Hydrolyse des Polyhydrazids der aus geeigneten Bac.-subtilis-Stämmen isolierten D-Polyglutaminsäure vom durchschnittlichen Molgewicht 6400 (die nach serologischen und analytischen Belegen mit der aus der Milzbrandbazillen-Kapsel isolierten D-Polyglutaminsäure ungefähr gleichen Molgewichtes gleich zu sein scheint<sup>1</sup>) in präparativ nachweisbarer Menge nur  $\beta$ -Formylpropionsäure (III), jedoch keine  $\alpha$ - $\gamma$ -Diaminobuttersäure (VI) liefert. Daraus wurde auf das Vorherrschen der  $\gamma$ -Glutamyl-Bindungen geschlossen, um so mehr, da der analoge Abbau des Polyhydrazids synthetisch gewonnener  $\alpha$ -L-Polyglutamin-

<sup>1</sup> G. IVÁNOVICS und V. BRUCKNER, *Naturwissenschaften* 25, 250 (1937); *Z. Immunforsch.* 90, 304; 91, 175 (1937).

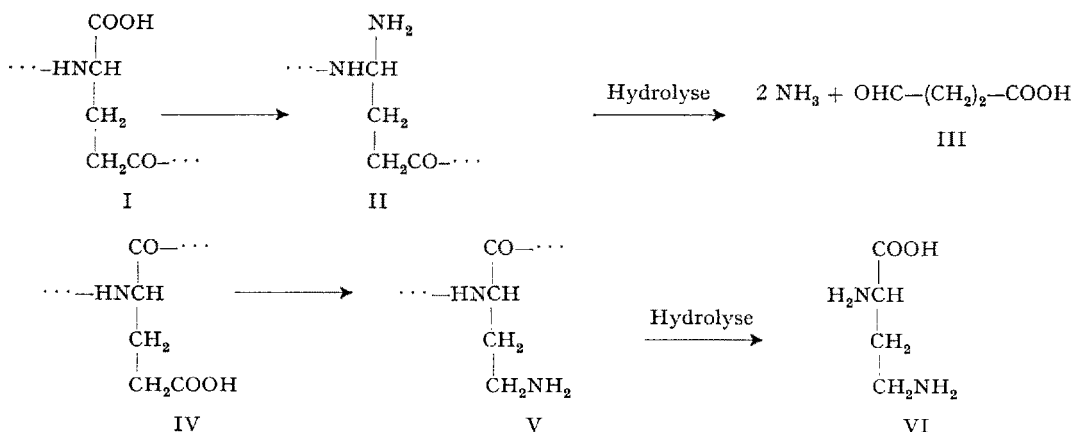
<sup>2</sup> M. BOVARNICK, *J. Biol. Chem.* 145, 415 (1942). – W. E. HANBY und H. N. RYDON, *Biochem. J.* 40, 297 (1946). – G. PONGOR, *Exper.* 6, 421 (1950).

<sup>3</sup> G. IVÁNOVICS und V. BRUCKNER, *Naturwissenschaften* 25, 250 (1937); *Z. Immunforsch.* 90, 304; 91, 175 (1937). – V. BRUCKNER, G. IVÁNOVICS und M. KOVÁCS OSKOLÁS, *Magyar. Chem. Polyóirat* 45, 131 (1939); vgl. *Chem. Zentr.* 1, 3280 (1940) und *Chem. Abstr.* 34, 3766 (1940). – V. BRUCKNER und M. KOVÁCS OSKOLÁS, *Acta Univ. Szegediensis (Chem. et Phys.)* 1, 144 (1943); vgl. *Chem. Abstr.* 41, 7423 (1947).

<sup>4</sup> M. BOVARNICK, *J. Biol. Chem.* 145, 415 (1942). – W. E. HANBY und H. N. RYDON, *Biochem. J.* 40, 297 (1946). – V. BRUCKNER, G. IVÁNOVICS und M. KOVÁCS OSKOLÁS, *Magyar. Chem. Polyóirat* 45, 131 (1939); vgl. *Chem. Zentr.* 1, 3280 (1940) und *Chem. Abstr.* 34, 3766 (1940). – V. BRUCKNER und M. KOVÁCS OSKOLÁS, *Acta Univ. Szegediensis (Chem. et Phys.)* 1, 144 (1943); vgl. *Chem. Abstr.* 41, 7423 (1947). – H. N. RYDON, *Biochemical Society Symposia*, Nr. 1, S. 42 (Cambridge 1948).

<sup>5</sup> W. E. HANBY und H. N. RYDON, *Biochem. J.* 40, 297 (1946).

<sup>6</sup> J. KOVÁCS und V. BRUCKNER, *Research* 5, 194 (1952); *Chem. Soc.* 1952, 4255.



säure in der Tat zur erwarteten  $\alpha$ - $\gamma$ -Diaminobuttersäure führte<sup>1</sup>.

Beim geschilderten Abbau der nativen D-Polyglutaminsäure konnten nur 14,5% derjenigen  $\beta$ -Formylpropionsäure-Menge in Form ihres p-Nitrophenylhydrazons isoliert werden, die aus  $\gamma$ -Polyglutaminsäure theoretisch zu erwarten wäre. Diese geringe Ausbeute lässt sich zwar annehmbar begründen, gefährdet aber trotzdem die Zuverlässigkeit des Rückschlusses auf das Vorherrschen der  $\gamma$ -Glutamyl-Bindungen.

Es wurde jetzt gefunden, dass der mit alkalischer Natriumhypochlorit-Lösung durchgeführte Hofmannsche Abbau und eine darauffolgende saure Hydrolyse des Polyamids der aus geeigneten Bac.-subtilis-Stämmen isolierten D-Polyglutaminsäure in erheblich besserer Ausbeute  $\beta$ -Formylpropionsäure liefert. Aus 50 mg des Polyamids, dessen Amidierungsgrad rund 90% betrug, wurden nach erfolgtem Abbau 38 mg  $\beta$ -Formylpropionsäure-p-nitrophenylhydrazon isoliert. Kontrollversuche zeigten, dass aus 36 mg reiner  $\beta$ -Formylpropionsäure (einer Menge, die aus 50 mg  $\gamma$ -Polyglutaminsäure-polyamid vom Amidierungsgrad 90% theoretisch zu erwarten ist) nach genau derselben Säurebehandlung und weiteren Verarbeitung, wie dies bei der Hydrolyse des Abbauproduktes geschieht, 39–45 mg ihres p-Nitrophenylhydrazons erhalten werden. Dies zeigt nun ganz entschieden an, dass in der untersuchten D-Polyglutaminsäure  $\gamma$ -Glutamyl-Bindungen vorherrschen, und zwar in einem derart überwiegendem Mass, das die Anwesenheit von  $\alpha$ -Glutamyl-Bindungen schon äusserst fraglich macht.

Die Beweiskraft dieses Abbauergebnisses liess sich auch dadurch bekräftigen, dass der analoge Abbau des synthetisch dargestellten  $\alpha$ -L-Polyglutaminsäure-polyamids (L-Polyglutamin) zu  $\alpha$ - $\gamma$ -Diaminobuttersäure führte und als Abbauprodukt  $\beta$ -Formylpropionsäure hier nicht nachgewiesen werden konnte.

Da im Laufe des Abbaues jeder  $\gamma$ -Glutamyl-Rest 2 Mole  $\text{NH}_3$  liefern sollte (I  $\rightarrow$  II  $\rightarrow$  III), während bei  $\alpha$ -Glutamyl-Resten dies nicht der Fall ist (IV  $\rightarrow$  V  $\rightarrow$  VI), wurde auch versucht, durch Ammoniakbestimmungen auf das Zahlenverhältnis der zwei Bindungstypen zu schliessen. Es zeigte sich, dass bei geeigneter Arbeitsweise beim Abbau des Polyamids der nativen D-Polyglutaminsäure Ammoniakmengen zu fassen sind, die – übereinstimmend mit den präparativen Ergebnissen – für ein reines  $\gamma$ -Bindungssystem sprechen. Die Zuverlässigkeit dieser Methode bedarf aber einer noch ausführlicheren Überprüfung, da Kontrollversuche zeigten, dass auch beim analogen Abbau des L-Polyglutamins

Ammoniak in nicht vernachlässigbarer Menge freigesetzt wird.

Eine ausführliche Mitteilung soll demnächst an anderer Stelle erscheinen.

V. BRUCKNER, J. KOVÁCS, K. KOVÁCS und H. NAGY

Organisch-Chemisches Institut der Universität Budapest, den 2. Oktober 1952.

#### Summary

Poly-D-glutamic acid isolated from the culture medium of *Bac. subtilis* was converted to the corresponding polyamide and then subjected to Hofmann degradation and acid hydrolysis. The amount of formed  $\beta$ -formylpropionic acid suggests such a predominancy of the  $\gamma$ -glutamyl bonds that an eventual presence of  $\alpha$ -glutamyl bonds hardly requires further consideration.

#### Über die Reinigung von Pektinase

Pektinstoffe werden von den Enzymen Pektinase (Polygalakturonase) unter Aufspaltung der glykosidischen Bindungen der Fadenmolekel und Pektase (Pektinesterase) unter Verseifung der Methylestergruppen angegriffen<sup>1</sup>. Beide Enzyme sind oft zusammen anzutreffen, wobei Pektase die Wirksamkeit der Pektinase zu beeinflussen vermag<sup>2</sup> und umgekehrt. Für Untersuchungen über die Eigenschaften der Pektinase ist daher eine quantitative Eliminierung der Pektase unerlässlich. Diese erfolgt meist durch Veränderung des pH-Wertes der Lösung<sup>3</sup> oder Behandlung mit Kationenaustauschern<sup>4</sup> und anderen Adsorptionsmitteln<sup>5</sup>. Dabei war bisher immer ein erheblicher Aktivitätsverlust der isolierten Pektinasekomponente zu beobachten. Auch papierchromatographisch kann eine Trennung, jedoch nur in geringeren Mengen, erreicht werden<sup>6</sup>.

Im folgenden wird gezeigt, dass eine quantitative Eliminierung der Pektase aus Enzymmischlösungen durch

<sup>1</sup> Vgl. Z. I. KERTESZ, *The Pectic Substances* (Interscience Publ., New York, N. Y. 1951), S. 333 ff.

<sup>2</sup> E. F. JANSEN, L. R. MACDONNELL und R. JANG, *Arch. Biochem.* 8, 113 (1945). – J. MATUS, *Ber. Schweiz. bot. Ges.* 58, 319 (1948). – R. J. MCCOLLOCH und Z. I. KERTESZ, *Food Technol.* 3, 94 (1949).

<sup>3</sup> H. ROTHSCILD, *Enzymologia* 5, 359 (1938). – E. F. JANSEN und L. R. MACDONNELL, *Arch. Biochem.* 8, 97 (1945). – H. LINEWEAVER, R. JANG und E. F. JANSEN, *Arch. Biochem.* 20, 137 (1949).

<sup>4</sup> R. J. MCCOLLOCH und Z. I. KERTESZ, *J. Biol. Chem.* 160, 149 (1945). – P. W. TALBOYS, *Nature* 166, 1077 (1950).

<sup>5</sup> E. SCHUBERT, *Nature* 169, 931 (1952); *Bioch. Z.* 323, 78 (1952).

<sup>6</sup> W. W. REID, *Nature* 166, 569 (1950).

<sup>1</sup> J. KOVÁCS, V. BRUCKNER und K. KOVÁCS, *Chem. Soc. (im Druck)*.