

### 36. Hans v. Euler und Karl Josephson: Enzymatische Spaltung von Dipeptiden (I).

[Aus d. Biochem. Laborat. d. Universität Stockholm.]  
(Eingegangen am 23. Dezember 1925.)

Nachdem die Anwendung des Massenwirkungsgesetzes bei der theoretischen Behandlung der Enzym-Reaktionen im Falle von Zucker hydrolysierenden Enzymen zur Entwicklung der enzymatischen Kinetik in allen wesentlichen Punkten sich als unentbehrlich erwiesen hat, so ist zu erwarten, daß die Übertragung dieser Betrachtungsweise auf andere Enzym-Reaktionen neue Gesichtspunkte sowohl bezüglich der Wirkungsweisen solcher Enzyme wie auf dem Gebiet der enzymatischen Reaktionskinetik überhaupt darbieten wird.

Wir haben dabei zuerst die enzymatische Spaltung von Dipeptiden von diesem Standpunkt aus aufs neue zu studieren begonnen, und zwar besonders aus Gründen, welche der eine von uns schon vor längerer Zeit hervorgehoben hat<sup>1)</sup>: In den Dipeptiden besitzen wir ein Material, welches hinsichtlich Konstitution, elektrochemischen Eigenschaften usw. genau definiert ist. Dasselbe gilt auch, was von Bedeutung ist, bezüglich der Endprodukte der enzymatischen Dipeptid-Spaltung, der Aminosäuren.

Die Spaltung des Glycyl-glycins durch Darm- oder Hefen-Erepsin wurde schon früher untersucht. Dabei wurde besonders die Kinetik der Spaltung und die Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit von der Acidität des Reaktionsmediums untersucht. Als  $p_H$ -Optimum der Wirkung des Darm-Erepsins hatte sich nach den Versuchen Dernbys<sup>2)</sup>  $p_H =$  rund 8.0 und für die Wirkung des Hefen-Erepsins  $p_H = 7.8$  ergeben, wobei Glycyl-glycin als Substrat verwendet wurde. Nach den Versuchen von Abderhalden und Fodor<sup>3)</sup> soll das  $p_H$ -Optimum von der Natur des Substrates abhängig sein.

Die Versuche, welche wir im Folgenden mitteilen, betreffen besonders die Abhängigkeit der Wirkung des Darm-Erepsins von der Acidität und von der Konzentration des Substrates (Glycyl-glycin). Im Anschluß hieran und im Anschluß an unsere früheren Vorschläge zur Bezeichnung der enzymatischen Wirksamkeit von Enzym-Präparaten<sup>4)</sup> haben wir einen Ausdruck zur Charakterisierung der Aktivität von Erepsin-Präparaten aufgestellt, nämlich die Glycylglycin-Spaltungsfähigkeit

$$\text{Gl. f} = \frac{k}{g \text{ Enzym-Präparat}}$$

In dieser Formel bedeutet  $k$  den nach der Formel für monomolekulare Reaktionen berechneten Reaktionskoeffizienten  $k = 1/t \cdot \log(a/a-x)$ . Die Messung von  $k$  wird bei 37°, bei der optimalen Acidität ( $p_H$  bei Beginn der Messung = 7.9—8.0) und bei 0.05-normaler Konzentration des Glycyl-glycins ausgeführt. Das Totalvolumen der Reaktionsmischung beträgt 25 ccm.

1) Euler, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 2, Nr. 31 und 39 [1907]; H. 51, 213 [1907].

2) Dernby, Bio. Z. 81, 107 [1917], und zwar S. 181.

3) Abderhalden und Fodor, Fermentforschung 1, 533 [1916].

4) Euler und Josephson, B. 56, 1749 [1923]; Josephson, H. 147, 1 [1925], und zwar S. 26.

## Beschreibung der Versuche.

### Das Enzym-Material.

Als Ausgangsmaterial zur Darstellung unserer Enzym-Präparate haben wir die nach dem Waschen des Darms mechanisch abgeschabte Schleimhaut des Dünndarms vom Schwein benutzt. Aus der Schleimhaut wurde durch Extraktion mit Glycerin (Schütteln auf der Schüttelmaschine) während zwei Tagen und nachherige Filtration durch Faltenfilter ein klarer, hellgelb gefärbter Extrakt erhalten. 1 ccm dieses Extraktes bewirkte in 90 Min. 21-proz. Spaltung von 25 ccm 0.1-n. Glycylglycin-Lösung.

Wir haben zuerst versucht, eine erste Reinigung des Glycerin-Extraktes durch Dialyse zu erzielen. Dabei traten aber sehr starke Verluste an Aktivität ein. So bewirkten 5 ccm eines dialysierten Darm-Extraktes (Trockengewicht = 11.2 mg) innerhalb 24 Stdn. in 25 ccm 0.1-n. Glycylglycin-Lösung eine Spaltung von nur 11%. In 0.05-n. Lösung betrug der Spaltungsgrad in 24 Stdn. rund 15%,  $k$  also =  $0.49 \times 10^{-4}$ . Gl. f wird hieraus zu 0.0044 berechnet<sup>5)</sup>.

Um wirksamere Präparate zu erhalten, haben wir zur Zeit auf die Dialyse verzichtet und haben die Reinigung durch Alkohol-Fällung ausgeführt. Durch die Alkohol-Fällung werden die Präparate von Glycerin befreit, und durch Wegschaffung von Verunreinigungen wird der Reinheitsgrad erhöht. Die Inaktivierung scheint nur ganz unbedeutend zu sein.

Beispiel der Reinigung durch Alkohol-Fällung: Von dem oben erwähnten Darm-Extrakt wurden 85 ccm unter Kühlen und bei kräftigem Rühren in 250 ccm absol. Alkohol eingetragen. Die gebildete Fällung wurde durch Zentrifugieren von der alkohol. Flüssigkeit getrennt. Nach Waschen mit absol. Alkohol und Äther wurde das Präparat in einem Vakuum-Exsiccator von den letzten Äther-Resten befreit. Es wurden rund 0.8 g Trockenpräparat aus den 85 ccm Darm-Extrakt erhalten. Zur Aktivitätsbestimmung wurde 0.1 g mit 10 ccm destilliertem Wasser geschüttelt und 2 ccm der filtrierten Lösung auf Aktivität geprüft. Unter den Bedingungen bei der Bestimmung der Glycylglycin-Spaltungsfähigkeit ergab die 0.02 g des Trockenpräparates entsprechende Menge der Lösung  $k = 0.0009$ . Hieraus wird Gl. f des Trockenpräparates berechnet zu  $0.0009/0.02 = 0.045$ . Da aber das Trockengewicht der Enzym-Lösung nur 7.28 mg in 2 ccm betrug (wegen des Gehaltes des Trockenpräparates an nicht in Lösung gegangenen Eiweißstoffen), wird Gl. f für die Lösung zu  $0.0009/0.00728 = 0.12$  berechnet. Die so erhaltene Lösung (3) war also rund 27-mal so aktiv wie die dialysierte Lösung 2.

### Bemerkungen zur Versuchsmethodik.

Von den verschiedenen in der Literatur beschriebenen Methoden zur Verfolgung der Peptid-Spaltung haben wir, wie früher, uns der Formoltitrationsmethode nach Sørensen<sup>6)</sup> bedient. Diese Methode, welche bei Abwesenheit von Pufferzusätzen und bei Anwendung von Thymol-phthalein als Indicator bei der Bestimmung von Glycylglycin und von Glykokoll Analysenresultate ergibt, welche den nach der Methode von Willstätter und Waldschmidt-Leitz<sup>7)</sup> ausgeführten Analysen nicht nachstehen, scheint uns im vorliegenden Falle die zweckmäßigste und einfachste zu sein.

Analysen von Glycylglycin und Glykokoll: 2 ccm 0.5-n. Glycylglycin-Lösung verbrauchten 4.98 ccm 0.2-n. NaOH. Gef. 99.6% d. Th. — 2 ccm 0.5-n. Glykokoll-Lösung verbrauchten 4.91 ccm 0.2-n. NaOH. Gef. 98.2% d. Th. —, 5 ccm 0.05-n. Glycylglycin verbrauchten 1.27 ccm 0.2-n. NaOH. Gef. 101.6% der Th.

<sup>5)</sup> In einer Berechnung älterer Wirksamkeitsdaten (Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kem 9, Nr. 24 [1925]) ist v. rsehentlich Gl. f. = 5 statt =  $5.10^3$  angegeben. Das ältere Resultat stimmt mit dem hier für dialysierte Präparate gefundenen überein.

<sup>6)</sup> Sørensen, Bio. Z. 7, 43 [1907].

<sup>7)</sup> siehe hierzu Waldschmidt-Leitz, H. 132, 181 [1924], und zwar 195.

Bei der zeitlichen Verfolgung der Glycylglycin-Spaltung entnehmen wir die Proben (5 ccm) aus den in dem Thermostaten ( $37.00 \pm 0.05^\circ$ ) eingesenkten Reaktionsmischungen und tragen sie sofort in 5 ccm der Formolmischung ein. Dann wird mit 0.2-n. kohlen-säure-freier Natronlauge bis zur Erreichung derselben Blaufärbung wie bei der unmittel-bar vorher angesetzten Kontroll-Lösung titriert.

Die  $p_H$ -Bestimmungen führen wir unter Anwendung der Gaskettenmethode und bei Zimmertemperatur aus.

Wegen des reaktionshemmenden Einflusses von Phosphaten und wegen der Schwierig-keit, die pufferhaltigen Lösungen genau titrieren zu können, haben wir bei den im Fol-genden beschriebenen Versuchen keinen Puffer zu den Reaktionsmischungen zugesetzt. Durch Zusatz von Natronlauge wurde allerdings die gewünschte Acidität beim Anfang der Reaktion eingestellt. Da die Messungen nur die Anfangsgeschwindigkeiten betreffen, hat die mit dem Fortschritt der Reaktion eintretende Aciditätsänderung nur einen geringen Einfluß auf die Verwertbarkeit der Versuchsergebnisse. In den Versuchen zur Bestimmung der Aktivitäts- $p_H$ -Kurve wurde die Acidität am Anfang und am Ende eines einzelnen Versuchs bestimmt und der Mittelwert dieser beiden Bestimmungen als  $p_H$ -Wert angegeben.

#### Versuche mit variierenden Enzym-Mengen.

Mit einer Lösung aus dem alkohol-gefällten Präparat wurde eine Ver-suchsreihe mit variierenden Enzym-Mengen ausgeführt. Die Konzentration des Glycyl-glycins betrug bei jedem Versuch 0.05-n. Das Trockengewicht der Enzym-Lösung war 3.76 mg pro ccm.

Tabelle 1.

Spaltung des Glycyl-glycins mit Erepsin aus Schweinedarm. 0.05-n. Glycyl-glycin.  
Variierende Enzym-Mengen.

Enzym-Menge in 25 ccm Totalvolumen	Zeit in Minuten	ccm $n/5$ -NaOH Diff.	$k \times 10^4$	$k \times 10^4$
				ccm Enzym-Lösung
0.5 ccm	210	0.16	2.8	5.6
—	$\infty$	1.27	—	
1.0 ccm	125	0.20	5.9	5.5
—	210	0.32	6.0	
—	380	0.41	4.5	
2.0 ccm	125	0.37	12.0	5.6
—	180	0.44	10.3	
5.0 ccm	35	0.26	28.4	5.7
—	50	0.36	29.0	

Die Zahlen der letzten Spalte der Tabelle zeigen, daß Proportionalität zwischen Enzym-Menge und Reaktionskoeffizient erster Ordnung vorhanden ist. Gl. f läßt sich aus diesen Zahlen zu  $5.6 \times 10^{-4} / 3.76 \times 10^{-3} = 0.15$  be-rechnen, also noch etwas größer als der vorher angegebene Wert 0.12.

#### Aktivitäts- $p_H$ -Kurve der Glycylglycin-Spaltung.

Die ersten orientierenden Versuche über die  $p_H$ -Abhängigkeit der Erepsin-Wirkung<sup>\*)</sup> hatten ergeben, daß das  $p_H$ -Optimum der Spaltung des Glycyl-glycins durch Erepsin aus Schweinedarm bei  $p_H$  etwas  $>8$  liegt. Die späteren

\*) Euler, a. a. O; siehe auch Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 9, Nr. 24 [1925].

Versuche von Dernby<sup>\*)</sup>, welche unter Anwendung der Formoltitrationsmethode und unter Messung der Acidität mit strömendem Wasserstoff und Platin-Elektroden direkt im Reaktionsgemisch ausgeführt wurden, geben den Wert  $p_H = 7.9-8.0$  für das Optimum.

Unsere neuen Versuche zur Bestimmung der Aktivitäts- $p_H$ -Kurve sind mit Reaktionsmischungen von folgender Zusammensetzung ausgeführt:

5 ccm 0.25-n. Glycylglycin-Lösung
2 ccm Enzym-Lösung (3). Trockengewicht 8.2 mg.
a ccm 0.2-n. NaOH
18—a ccm destilliertes Wasser
25 ccm Totalvolumen.

Die in der Tabelle angegebenen  $p_H$ -Werte sind Mittelwerte der Messungen am Anfang und am Ende der einzelnen Versuche.

Tabelle 2.

Aktivitäts- $p_H$ -Kurve der Glycylglycin-Spaltung. Zu jedem Versuch 2 ccm Enzym-Lösung Nr. 3. 0.05-n. Glycyl-glycin.

$p_H$	Min.	ccm $n/_{10}$ -NaOH Diff.	$k \times 10^4$	Relative Reaktionsgeschwindigkeit
7.6	85	0.30	13.8	85
	120	0.37	12.5	
	$\infty$	1.27	—	
7.8	85	0.31	14.3	92
	120	0.42	14.5	
	120	0.45	15.8	
8.0	85	0.34	16.0	100
	120	0.43	15.0	
	120	0.34	16.0	
8.2	85	0.39	13.3	95
	120	0.27	12.2	
	120	0.36	12.1	
8.3	85	0.21	9.2	79
	120	0.23	7.2	
	120	0.03	—	
8.55	85	0.03	—	(9)
	120	0.07	(1.4)	
	180	0.07	(1.4)	

Das  $p_H$ -Optimum der Spaltung des Glycyl-glycins durch Darm-Erepsin (aus Schweinedarm) liegt also nach diesen Versuchen bei  $p_H = 8.0$  in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Dernby. In der Figur 1 ist die Aktivitäts- $p_H$ -Kurve graphisch wiedergegeben.

In dieses Optimum geht, wie früher schon von dem einen von uns betont wurde, die Salzbildung des Substrates und wohl auch die Salzbildung der Reaktionsprodukte ein; wir werden auf diesen Umstand bald ausführlicher zurückkommen.

Die Aktivitäts-[S]-Kurve der Glycylglycin-Spaltung.

Der Einfluß der Substrat-Konzentration auf die Geschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion wird, unter im übrigen konstanten Reaktions-

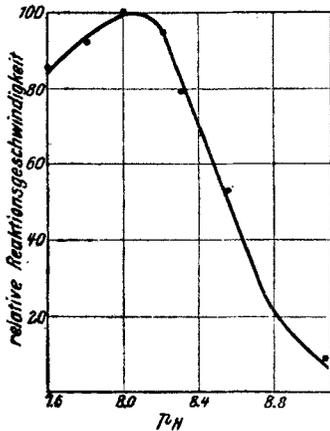
<sup>\*)</sup> Dernby, a. a. O.

bedingungen, von der Affinität zwischen Enzym und Substrat bestimmt. Die Form der Kurve, welche die Beziehung zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Substrat-Konzentration wiedergibt, ist im allgemeinen die einer Dissoziationskurve. Aus dem Verlauf dieser Kurve lassen sich Schlußfolgerungen über die Größe der Affinität zwischen Enzym und Substrat ziehen. Die Berechnung der Affinitätskonstante der Enzym-Substrat-Verbindung

$$K_M = \frac{[\text{Enzym-Substrat}]}{[\text{Enzym}] \times [\text{Substrat}]}$$

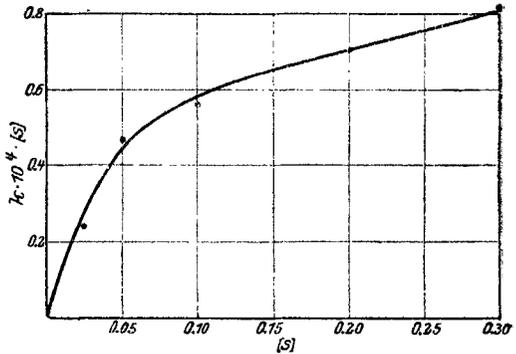
für verschiedene Enzyme hat nun das Ergebnis geliefert, daß diese Konstante im allgemeinen von der Größenordnung 1-100 ist. Wir haben einige Versuche gemacht, um diese Konstante der Erepsin-Glycylglycin-Verbindung wenigstens der Größenordnung nach zu schätzen.

Fig. 1.



Aktivitäts-pH-Kurve der Glycyl-glycin-Spaltung. Darm-Erepsin aus Schweine-Darm. 0.05-n. Glycyl-glycin.

Fig. 2.



Aktivitäts-[S]-Kurve der Glycylglycin-Spaltung. p<sub>H</sub> = 8.0.

Die Versuche beziehen sich teils auf ein dialysiertes Präparat, teils auf das stark aktive alkohol-gefällte Präparat. Wir führen die Versuche mit der dialysierten Lösung zuerst an.

Tabelle 3.

Spaltung des Glycyl-glycins bei verschiedenen Substrat-Konzentrationen. Zu jedem Versuch 5 ccm dialysierter Darm-Extrakt.

Konzentration des Glycyl-glycins	0.020-n.	0.040-n.	0.056-n.	0.10-n.	0.16-n.
Zunahme d. Alkaliverbrauchs nach 24 Stdn: (ccm n/8-NaOH). . .	0.11	0.17	0.20	0.28	0.41

Wegen der sehr schwachen Wirksamkeit der angewandten Enzym-Lösung und wegen der dadurch bedingten langen Versuchszeiten läßt sich diese Versuchsreihe nur in sehr beschränktem Maße verwerten: Die Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit bei Er-

höhung der Substrat-Konzentration erfolgt ziemlich langsam, was auf eine ziemlich geringe Affinität zwischen Enzym und Substrat deutet.

Die Versuchsreihe mit dem alkohol-gefällten Präparat ist in der Tabelle 4 zusammengestellt. Bei jeder Substrat-Konzentration wurden drei Bestimmungen des Reaktionskoeffizienten erster Ordnung ausgeführt. Der auf die Zeit 0 extrapolierte Reaktionskoeffizient, mit der entsprechenden Substrat-Konzentration multipliziert ( $dx/dt$  bei der Zeit  $0 = k \times a$ ), ist ein Maß für

Tabelle 4.

Aktivitäts-[S]-Kurve der Glycylglycin-Spaltung.  $p = 8.0$ . Zu jedem Versuch 2 ccm Lösung Nr. 3. Volumen des Reaktionsgemisches = 25 ccm.

Konzentration des Glycylglycins [S]	Min.	ccm $n/2$ -NaOH Diff.	$k \times 10^4$	$k \times 10^4$ [S]
0.025-n.	0	—	(9.6)	0.24
	60	0.07	8.8	
	120	0.12	7.9	
	180	0.16	7.3	
	$\infty$	0.61	—	
0.050-n.	0	—	(9.5)	0.47
	60	0.14	8.5	
	120	0.23	7.2	
	180	0.30	6.5	
	$\infty$	1.27	—	
0.10-n.	0	—	(5.6)	0.56
	60	0.17	5.2	
	120	0.30	4.7	
	180	0.41	4.4	
	$\infty$	2.48	—	
0.20-n.	0	—	(3.5)	0.70
	60	0.23	3.4	
	120	0.44	3.3	
	180	0.63	3.2	
	$\infty$	5.00	—	
0.30-n.	0	—	(2.7)	0.81
	60	0.26	2.5	
	120	0.47	2.3	
	180	0.66	2.2	
		7.49		

die Geschwindigkeit der Reaktion. Die in der vorletzten Spalte der Tabelle angeführten Zahlen zeigen nun, daß die Reaktionskoeffizienten schon bei Konzentrationen über etwa 0.05-n. Glycyl-glycin abnehmen, so daß das Produkt Reaktionskoeffizient mal Substrat-Konzentration nicht mehr proportional der Substrat-Konzentration anwächst, sondern langsamer. Die Aktivitäts-[S]-Kurve, welche sich aus diesen Zahlen konstruieren läßt, hat deshalb angenähert die Form einer Dissoziationskurve (s. Fig. 2). Sucht man aus den Zahlen die Affinitätskonstante der Enzym-Substrat-Verbindung zu berechnen, so findet man den angenäherten Wert  $K_M = 15$ .

Wegen der sauren und basischen Eigenschaften des Substrates ist zu erwarten, daß die Salzbildung am Substrat für die Affinität zwischen Enzym und Substrat eine große Rolle spielt. Die Aktivitäts-[S]-Kurve dürfte sich deshalb mit der Acidität ändern, wie auch umgekehrt die  $p_H$ -Kurve sich mit der Substrat-Konzentration ändern kann<sup>10)</sup>.

Der vorläufig angegebene Wert für  $K_M$  entspricht der Michaelisschen Konstante<sup>11)</sup> für die Gesamt-Affinität zwischen Enzym und Substrat. Nach unseren neueren Anschauungen über die Bindung eines hydrolysierbaren Substrates an die beiden Komponenten bleibt auch noch zu ermitteln, wie sich die Gesamt-Affinität auf die beiden Aminosäure-Reste verteilt<sup>12)</sup>.

#### Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Erepsin-Präparaten.

Die in der Tabelle 4 angeführte Versuchsreihe zeigt außer der Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit von der Konzentration des Glycyl-glycins, daß der nach der Formel für monomolekulare Reaktionen berechnete Reaktionskoeffizient mit Fortschritt der Reaktion abnimmt. Dies hat seinen Grund teils in der Aciditätsverschiebung, teils in der Unbeständigkeit des Enzyms. Zu einer Charakterisierung der Aktivität von Erepsin-Präparaten aus Darm dürfte allerdings die monomolekulare Reaktionskonstante anwendbar sein. Wird die Acidität des Reaktionsmediums bei Anfang der Reaktion auf  $p_H = 7.9-8.0$  durch Zusatz von Natronlauge eingestellt, dann sind die erwähnten Reaktionskoeffizienten innerhalb der ersten Drittel der Reaktion genügend konstant. Da die Reaktionskoeffizienten in Lösungen, enthaltend bis zu 0.05-n. Glycyl-glycin, von der Substrat-Konzentration ziemlich unabhängig sind, läßt sich also die Aktivität eines Erepsin-Präparates einfach durch die Formel

$$\text{Glycylglycin-Spaltungsfähigkeit (Gl. f)} = \frac{k}{g \text{ Enzym-Präparat}}$$

ausdrücken. Die Proportionalität dieses Ausdrucks mit der Enzym-Menge geht aus den Zahlen der Tabelle 1 hervor.

Wir führen die Aktivitätsbestimmung in folgender Weise aus: Zu der Versuchsmischung, enthaltend in 25 ccm Totalvolumen (nach Zugabe des Enzyms) 0.05-n. Glycyl-glycin + Natronlauge ( $p_H = 7.9-8.0$ ), wird nach dem Erwärmen der Lösung auf 37° durch Einsenken in einen Thermostaten die Enzym-Lösung zugegeben, die erste Probe (5 ccm) sofort aus der Lösung entnommen, in 5 ccm Formalmischung eingetragen und mit 0.2-n. Natronlauge titriert. Die nach verschiedenen Zeiten entnommenen späteren Proben werden dann in gleicher Weise behandelt und titriert. Die angewandte Reaktionsmischung reicht zu drei Bestimmungen (außer der Nullprobe) des Reaktionskoeffizienten. Die übrigbleibenden 5 ccm sind zur Messung der Acidität bestimmt.

<sup>10)</sup> vergl. Euler, Josephson und Myrbäck, H. 184, 39 [1924]; K. Josephson, H. 147, 1 [1925], und zwar 81 ff.

<sup>11)</sup> Michaelis und Menten, Bio. Z. 49, 333 [1913].

<sup>12)</sup> Euler, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 9, Nr. 13 [1924]; H. 148, 79 [1925]; K. Josephson, H. 147, 1 [1925].

Wir haben es bis auf weiteres vorgezogen, die Aktivitätsbestimmungen ohne Puffer und ohne Zusatz von Aktivatoren ( $\text{Ca}^{++}$ ) auszuführen, da der hemmende Einfluß des ersteren und die Aktivierungserscheinungen an der Darm-Peptidase noch nicht genügend durchforscht sind<sup>13)</sup>.

### 37. Rudolf Lesser und Georg Gad: Über die Acetylierung aromatischer Oxy-carbonsäuren.

(Eingegangen am 6. Januar 1926.)

Aromatische Oxy-carbonsäuren wurden bisher wohl meistens durch Erhitzen mit Essigsäure-anhydrid mit oder ohne Zusatz eines Kondensationsmittels oder Katalysators acetyliert. Nachdem wir kürzlich beobachteten, daß sich die 2-Oxy-4-naphthoesäure sehr bequem durch Behandeln mit Essigsäure-anhydrid in wäßrig-alkalischer Lösung in die *O*-Acetylverbindung<sup>1)</sup> überführen läßt, haben wir dies Verfahren auf andere Oxy-carbonsäuren angewendet und gefunden, daß es allgemeine Geltung besitzt, angenommen die Fälle, in denen die Hydroxylgruppe der Carboxylgruppe benachbart ist. Hydroxylgruppen in *o*-Stellung zu letzterer werden im Gegensatz zu der üblichen Methode ausnahmslos auf diese Weise nicht acetyliert, und man hat daher ein sehr bequemes Mittel an der Hand, bei Gegenwart mehrerer Hydroxylgruppen eine in *o*-Stellung befindliche nachzuweisen und andererseits partiell acetylierte Derivate zu gewinnen. Nicht acetyliert werden also die Salicylsäure, 1-Oxy-2-naphthoesäure und 2-Oxy-3-naphthoesäure, während aus der  $\beta$ -Resorcylsäure ( $\text{CO}_2\text{H}:\text{OH}:\text{OH} = 1:2:4$ ) ausschließlich die bisher unbekannte 4-Acetoxy-2-oxy-benzoessäure und aus der Hydrochinon-carbonsäure die ebenfalls unbekannte 5-Acetoxy-2-oxy-benzoessäure entsteht. Die Phloroglucin-carbonsäure liefert ganz entsprechend die 4-Acetoxy-2.6-dioxy-benzoessäure, und die *m*- wie die *p*-Oxy-benzoessäure glatt die betreffende acetylierte Säure. Ebenso leicht geht die Gallussäure und die Protocatechusäure in die Triacet- bzw. Diacetverbindung über. Bei partieller Acetylierung wird zunächst die in *m*-Stellung zur Carboxylgruppe befindliche Hydroxylgruppe acetyliert, und dementsprechend bildet die Gallussäure die 3.5-Diacet- und die 3-Monoacet-gallussäure, die Protocatechusäure höchst wahrscheinlich die 3-Acet-protocatechusäure. Durch die Acetylierung wird die Eisenchlorid-Reaktion der Säuren meistens in charakteristischer Weise verändert, und bei mehrfach hydroxylierten Säuren tritt, falls eine Hydroxylgruppe sich in *o*-Stellung zur Carboxylgruppe befindet, die bekannte violette Salicylsäure-Reaktion auf. Die Ausbeuten sind zum Teil quantitativ, während nur ein geringer Überschuß von Essigsäure-anhydrid über die berechnete Menge erforderlich ist, so daß die Methode auch präparativ der bisherigen überlegen ist.

#### Beschreibung der Versuche.

Zur Darstellung der 4-Acetoxy-1-benzoessäure tropft man zu einer ca. 40° warmen Lösung von 5,6 g *p*-Oxy-benzoessäure in 80 ccm *n*-Natronlauge unter Rühren 5 g Essigsäure-anhydrid, rührt unter schließlicher Eis-

<sup>13)</sup> vergl. hierzu auch die Ergebnisse von Willstätter und Graßmann, H. 138, 184 [1924].

<sup>1)</sup> B. 58, 2553 [1925].