

Phenyl-magnesiumbromid und Cyan-ameisensäure-äthylester.

6 g (1 Mol.) des Esters wurden in Äther gelöst und dann zu einer Grignard-Lösung aus 34 g ( $3\frac{1}{2}$  Mol.) Brom-benzol hinzugefügt. Es trat eine sehr kräftige Reaktion ein; die Zersetzung des Produktes wurde in der üblichen Weise vorgenommen und auch hier das Diphenyl mit Hilfe von Wasserdampf entfernt. Ausbeute an 2-mal aus rektifiziertem Alkohol umgelöstem Produkt: 3 g; hexagonale Prismen vom Schmp.  $161-162^{\circ}$ , die sich mit Hilfe der bei dem Produkt aus Oxamäthan benutzten Reaktionen als Triphenyl-carbinol charakterisieren ließen.

**241. H. v. Euler und K. Josephson:**  
**Über die Spezifität der Hefe- und Darm-Peptidasen.**  
**(5. Mitteilung über Peptidasen<sup>1)</sup>).**

[Aus d. Chem. Laborat. d. Universität Stockholm.]

(Eingegangen am 6. Mai 1927.)

Durch Studium der Angreifbarkeit verschiedener Derivate des einfachsten Substrates der Peptidase-Wirkung (Glycyl-glycin) durch das Erepsin aus Schweinedarm haben wir die Frage betr. der Spezifität des bei der Spaltung des Glycyl-glycins wirksamen Enzyms in Angriff genommen. Wir haben dabei den Versuch eingeleitet mit der Untersuchung der verschiedenen Angreifbarkeit von Substraten, sowie mit dem Studium der Hemmung der Enzym-Wirkung durch verschiedene Stoffe. Dadurch konnten wir Rückschlüsse ziehen auf die Gruppen des Substrates und die Gruppen in dem Enzym, welche für die Bindung eines einfachen Substrates mit bekannter Konstitution in erster Linie verantwortlich sind. Aus unseren Versuchen schien uns die folgende Schlußfolgerung gezogen werden zu können: Die Bindung eines Dipeptids (Glycyl-glycin) an die Peptidase des Schweinedarms wird wenigstens zum Teil durch die freie Aminogruppe des Substrates vermittelt, und die Bindung dieser Aminogruppe an das Enzym erfolgt mit großer Wahrscheinlichkeit an einer Carbonylgruppe in dem Enzym.

Für diese Auffassung haben wir die folgenden experimentellen Befunde angeführt: Die Spaltbarkeit des Glycyl-glycins wird aufgehoben bei Substitution in der freien Aminogruppe durch Einführung des Benzoylrestes<sup>2)</sup>. Dabei verschwindet nicht nur die Spaltbarkeit durch die Peptidase, sondern die Affinität zu dem Enzym wird gleichfalls aufgehoben, indem eine Hemmung der Glycyl-glycin-Spaltung bei Zusatz von Benzoyl-glycyl-glycin nicht eintritt. Ferner werden Acetursäure und Hippursäure von der Darm-Peptidase nicht gespalten oder gebunden. Dagegen hatten wir bei der optimalen Acidität der Peptidase-Wirkung Hemmung durch Glykokoll wie auch  $\alpha$ -Alanin gefunden<sup>3)</sup>. Die Hemmung durch die Aminosäuren ist aber in hohem Maße von der Acidität bzw. Alkalinität abhängig.

<sup>1)</sup> 1. Mitt.: H. v. Euler und K. Josephson, B. **59**, 226 [1926]; 2. Mitt.: Ztschr. physiol. Chem. **157**, 122 [1926]; 3. Mitt.: Ztschr. physiol. Chem. **161**, 270 [1926]; 4. Mitt.: K. Josephson und H. v. Euler, Ztschr. physiol. Chem. **162**, 85 [1926]. — Siehe auch H. v. Euler, Chemie der Enzyme, II. Teil, 2. Abschnitt, München 1927, S. 418ff.

<sup>2)</sup> vergl. T. Imai, Ztschr. physiol. Chem. **136**, 205 [1924].

<sup>3)</sup> Im Gegensatz zu den Angaben von K. G. Dernby, Biochem. Ztschr. **91**, 107 [1916/17].

Während, wie erwähnt, bei  $p_H = 7.8-8$  die Hemmung ziemlich groß ist, scheint die Hemmung beim Neutralpunkt kaum meßbar zu sein. Bei Verstärkung der Alkalinität wird die Affinität der Amino-säure zu der Peptidase vergrößert. Eine Folge dieses Einflusses der Acidität auf die Affinität der Peptidase zu der Amino-säure ist, daß das Aktivitäts- $p_H$ -Optimum von der anwesenden Amino-säure abhängig ist.

Die Anschauung, daß die Aminogruppe des Dipeptids und der Amino-säure für die Bindung an das Enzym von großer Bedeutung ist, wurde dann weiter durch die Beobachtungen unserer 4. Mitteilung gestützt, daß die Peptidase-Wirkung des Darm-Erepsins durch gewisse Reagenzien auf Carbonylgruppen, nämlich Phenyl-hydrazin, Cyankalium und Sulfit, stark gehemmt wird. Es wurde also durch diese Versuche wahrscheinlich gemacht, daß die Aminogruppe in dem einfachen Dipeptid oder der Amino-säure gerade durch eine Carbonylgruppe in dem Enzym gebunden wird.

In der Zeit seit dem Erscheinen unserer Mitteilungen über das vorliegende Thema haben nun E. Waldschmidt-Leitz, W. Graßmann und A. Schöffner<sup>4)</sup> sich mit der Frage über die Spezifität der Peptidasen beschäftigt. Nachdem durch die Abgrenzung der Peptidase (des Erepsins) von dem Trypsin die Frage aufgeworfen wurde, „wo man die Grenze zwischen ereptischer und tryptischer Spaltbarkeit zu suchen hat, etwa bei einer bestimmten Länge der Peptid-Ketten oder bei Einführung besonderer Substituenten, und welche Gruppen in den spezifischen Substraten für die Affinität von Peptidase einerseits und von Protease andererseits verantwortlich sind“, haben sich die erwähnten Forscher der von uns in Angriff genommenen Frage hinsichtlich der Spezifität der Peptidase zugewandt<sup>5)</sup>. E. Waldschmidt-Leitz, W. Graßmann und A. Schöffner finden, daß die von uns untersuchten Beispiele nicht zahlreich und nicht verschieden genug gewählt sind, um sichere Unterlagen für die von uns geäußerte Vorstellung zu ergeben. Wenn wir mit den Einwänden von E. Waldschmidt-Leitz und seinen Mitarbeitern über die geringe Zahl der untersuchten Substrate zum Teil einverstanden sein können, so möchten wir doch betonen, daß die Schlußfolgerung hinsichtlich der für die Affinitätsmessung zugänglichen Bindung des Dipeptids und der Amino-säure sich immerhin auf drei ganz verschiedenartige Beobachtungen stützt und zwar: 1. Die Hemmung durch Glykokoll und Alanin, sowie die Nicht-hemmung durch Glykokoll-Derivate; 2. Die Unangreifbarkeit des Benzoyl-glycyl-glycins; 3. Die Hemmung der Peptidase-Wirkung durch Carbonyl-Reagenzien.

Von besonders hohem Interesse erschienen uns die Beobachtungen über die verschiedene Angreifbarkeit der untersuchten Substrate durch tierisches und pflanzliches Erepsin, welche E. Waldschmidt-Leitz, W. Graßmann und A. Schöffner mitgeteilt haben. Diese Beobachtungen führen die zitierten Autoren auf „einen spezifischen, qualitativen Unterschied in der Spaltbarkeit der untersuchten Peptamine durch tierisches und pflanzliches Erepsin“ zurück.

Dieser charakteristische Unterschied in der Spezifität der Peptidasen aus Hefe und aus Darm-Schleimhaut wird allerdings nicht bei den von uns

4) B. 60, 359 [1927].

5) vergl. hierzu auch H. v. Euler und K. Josephson, Ztschr. physiol. Chem. 157, 122, und zwar S. 139 [1926].

früher bei der Untersuchung der Spezifität der Darm-Peptidase angewandten einfachen Substraten, Glycyl-glycin bzw. Benzoyl-glycyl-glycin oder auch die Biuretbase, wiedergefunden. Das Benzoyl-glycyl-glycin wird nämlich von unserem Hefe-Erepsin nicht gespalten, während die Biuretbase glatt gespalten wird. Auch die Hemmung der Hefe-Peptidase-Wirkung durch Glykokoll und Alanin ist von ähnlicher Größenordnung und in ähnlicher Weise von der Acidität des Reaktionsmediums abhängig wie die Hemmung bei der Darm-Peptidase.

Die Annahme, „daß für die Bindung des Darm-Erepsins an das Substrat hauptsächlich eine freie Aminogruppe, für die des Hefe-Enzyms aber besonders eine freie Carboxylgruppe gefordert werde, eine Unterscheidung, die an die Einteilung der rohrzucker-spaltenden Enzyme in Gluco- und in Fructo-Saccharasen nach R. Kuhn<sup>6)</sup> erinnern würde“, erhält also durch unsere Versuche keineswegs eine Stütze. Vielmehr sprechen unsere Ergebnisse dafür, daß die Bindung des Glycyl-glycins an den beiden Peptidasen aus Hefe und aus Schweinedarm in ähnlicher Weise erfolgt. Eine Einteilung der Peptidasen in Amino-Peptidasen und Carboxyl-Peptidasen in Analogie mit der Einteilung der Saccharasen in Gluco- und Fructo-Saccharasen scheint uns also noch nicht durchführbar. E. Waldschmidt-Leitz, W. Graßmann und A. Schöffner haben auch hervorgehoben, daß viele ältere Angaben der Literatur<sup>7)</sup> kaum mit einer solchen Annahme vereinbar sind. Im Falle des von uns untersuchten Benzoyl-glycyl-glycins und der Biuretbase von Th. Curtius<sup>8)</sup> konnten wir auch keine bemerkenswerten quantitativen Unterschiede im Wirkungsvermögen der angewandten Erepsin-Lösungen aus Hefe einerseits und Darm andererseits feststellen. Auch bei dem von E. Waldschmidt-Leitz, W. Graßmann und A. Schöffner gewählten Beispiel eines acylierten Dipeptids (Acetyl-*d, l*-phenylalanyl-*d, l*-alanin) sind die Unterschiede im Wirkungsvermögen der beiden Peptidasen nur quantitativer Art, indem beide Peptidasen Spaltung des acetylierten Dipeptids bewirkten, im Gegensatz zu dem benzoylierten Glycyl-glycin, welches wir nicht enzymatisch durch Peptidase spalten konnten.

Wenn wir also eine absolute Verschiedenheit hinsichtlich der Spezifität der Peptidasen der Hefe und des Darmes nicht als wahrscheinlich ansehen können<sup>9)</sup>, so erhebt sich die Frage, worin die Verschiedenheit der relativen Spezifität besteht, welche die beiden Peptidasen gegenüber verschiedenen Substraten zeigen, eine Verschiedenheit, wie sie E. Waldschmidt-Leitz, W. Graßmann und A. Schöffner beobachtet haben. Die erwähnten Forscher wollen die Wirkung der beiden Peptidasen in jedem Falle auf mehr

<sup>6)</sup> vergl. dazu R. Kuhn und G. E. v. Grundherr, B. **59**, 1655, und zwar S. 1658 [1926]; ferner auch die Ausführungen von H. v. Euler und K. Josephson, Ztschr. physiol. Chem. [1927] (im Druck).

<sup>7)</sup> E. Fischer und P. Bergell, B. **36**, 2592 [1903]; E. Abderhalden und A. H. Koelker, Ztschr. physiol. Chem. **54**, 363 [1907], **55**, 417 [1908]; E. Abderhalden und C. Brahm, Ztschr. physiol. Chem. **57**, 342 [1908]; T. Imai, Ztschr. physiol. Chem. **136**, 192, 205 [1924].

<sup>8)</sup> B. **37**, 1284 [1904].

<sup>9)</sup> Man beachte auch, daß die Aktivitäts- $p_{\text{H}}$ -Optima für die Hefe- und Darm-Peptidase zusammenfallen, was schon bei den absolut artverschiedenen Carbohydrasen nicht zutrifft. Vergl. ferner die interessanten Ergebnisse von P. A. Levene, Simms und Pfaltz, Journ. Biol. Chem. **70**, 253 [1926].

als nur eine Haftstelle im Substrate zurückführen. Diese Anschauungen erinnern also an die von uns seit 1924 diskutierte Möglichkeit über die Existenz getrennter Affinitätsgruppen in den Carbohydrasen, welche Affinitätsgruppen verschiedene Wirkungen und verschiedene Spezifität gegenüber den verschiedenen Substraten besitzen. Bezüglich der Affinität unserer Darm-Peptidase zu Glycyl-glycin und zu dessen Spaltungsprodukt Glykokoll haben wir an anderer Stelle eine vergleichende Berechnung der Affinitäten zu den beiden Stoffen gegeben<sup>10)</sup>. Unter Zugrundelegung der schon in unserer ersten Mitteilung gegebenen Berechnung der Affinitätskonstante der Glycyl-glycin-Darm-Peptidase haben wir aus Hemmungsversuchen bei der optimalen Acidität der Peptidase-Wirkung die Affinitätskonstante der Glykokoll-Peptidase-Verbindung zu schätzen gesucht. Unter Vorbehalt bzgl. der hypothetischen Berechnungsweise fanden wir die folgenden Werte für die beiden Affinitätskonstanten:

$$K_M = \text{rund } 15 \text{ für die Peptidase-Glycyl-glycin-Verbindung,}$$

$$K_M = \text{rund } 13 \text{ für die Peptidase-Glykokoll-Verbindung.}$$

Die nahe Übereinstimmung zwischen diesen Werten liefert unserer Ansicht nach keineswegs eine Stütze für die Auffassung, daß andere Affinitätsgruppen als die, welche Glykokoll binden können, die der Affinitätsmessung zugängliche Bindung des Glycyl-glycins an der Peptidase bedingen. Es scheint uns also in dieser Berechnung ein neues Kriterium vorzuliegen für die Bedeutung, welche den dem Glykokoll und dem Glycyl-glycin gemeinsamen Gruppen, und zwar besonders der Aminogruppe, als Affinitäts-Vermittler zukommt. Inwieweit bei anderen Substraten und besonders bei Verlängerung der Peptid-Kette andere Affinitätsgruppen bei der Bindung stärker ausgenutzt werden oder eingeschaltet werden können, ist noch unsicher; eine solche Möglichkeit scheint uns jedoch keineswegs ausgeschlossen zu sein. Besonders in Rücksicht auf die noch ganz ungeklärte Frage der Organ-Spezifität und der evtl. Mitwirkung von „Abwehrstoffen“ wollen wir weiter auf obige Probleme zurückkommen.

### Beschreibung der Versuche.

Die Enzymlösung, welche wir bei der Prüfung der Spezifität der Hefe-Peptidase angewandt haben, wurde durch Autolyse von Oberhefe R aus Stockholms Norra Jästfabrik mit Essigester und folgender kurzer<sup>11)</sup> Dialyse in der unten beschriebenen Weise erhalten.

230 g Oberhefe R, welche von der Fabrik in abgepreßtem, sehr reinem Zustand geliefert wird, haben wir mit 50 ccm Wasser angerührt und dann 15 ccm Essigester hinzugegeben. Unter Umrühren ließen wir die Verflüssigung der Hefe während 15 Min. und bei Zimmer-Temperatur fortgehen. Es wurde dann mit 200 ccm Wasser verdünnt und durch Zusatz von verd. Ammoniak die Reaktion gegen Lackmus ganz schwach alkalisch gemacht. Während der noch 45 Stdn. fortgesetzten Autolyse wurde von Zeit zu Zeit verd. Ammoniak zwecks Neutralisierung der freigemachten Säure hinzugegeben,

<sup>10)</sup> H. v. Euler und K. Josephson, Über Enzymspezifität, Ztschr. physiol. Chem. [1927] (im Druck).

<sup>11)</sup> Über die Aktivitäts-Verminderung der Hefe-Peptidase bei längerer Dialyse und Reaktivierung durch das Dialysat vergl. H. v. Euler und K. Josephson, Ztschr. physiol. Chem. **161**, 270 [1926].

wobei die Reaktion immer ganz schwach alkalisch gegen Lackmus gemacht wurde. Die darauf folgende Filtration des Autolysates durch Faltenfilter lieferte innerhalb 6 Stdn. rund 100 ccm klares Filtrat, welches während 24 Stdn. in einer Kollodium-Membran gegen destilliertes Wasser dialysiert wurde. Bei der fortgesetzten Filtration wurden dann noch 175 ccm Autolyse-saft aus den autolysierten 230 g Hefe gewonnen.

Die dialysierte Enzymlösung wurde durch Zusatz von etwas Ammoniak wieder gegen Lackmus ganz schwach alkalisch gemacht. Das Trockengewicht dieser Lösung betrug 0.0100 g pro ccm. In 3 Stdn. bewirkten 5 ccm der Erepsin-Lösung 14-proz. Spaltung von 25 ccm *o.1-m.* Glycyl-glycin-Lösung bei einer Thermostaten-Temperatur von 30°. Die bei dieser Temperatur gemessene Glycyl-glycin-Spaltungsfähigkeit (Gl. f) wurde zu rund 0.008 berechnet<sup>12)</sup>.

Zu den im Folgenden beschriebenen vergleichenden Versuchen mit Darm-Peptidase, über welche wir an anderer Stelle ausführlicher berichtet haben<sup>13)</sup>, wurde teils ein aus der gewaschenen und abgeschabten Schleimhaut des Dünndarms vom Schwein gewonnener Glycerin-Extrakt, welcher eine hohe Erepsin-Wirkung, aber nur ein kaum meßbares Spaltungsvermögen gegenüber Pepton Witte besaß, teils ein aus diesem Glycerin-Extrakt durch Alkohol-Fällung gereinigtes Präparat benutzt.

#### Hemmung der Glycyl-glycin-Spaltung durch Glykokoll bei der optimalen Acidität der Peptidase-Wirkung.

Bei den Versuchen verwendeten wir Reaktionsmischungen von 25 ccm Totalvolumen. Zu jeder Versuchsmischung in den Versuchen in Tab. 1 und 2

Tabelle 1.  
Hemmung der Hefe-Peptidase-Wirkung durch Glykokoll.

Substrat	pH bei Versuchsbeginn <sup>14)</sup>	Zeit in Min.	Acid.-Zuwachs 0.2-n. NaOH ccm
<i>o.1-m.</i> Glycyl-glycin .....	7.7	300	0.45
<i>o.1-m.</i> Glycyl-glycin + <i>o.1-m.</i> Glykokoll	7.8	300	0.28

Tabelle 2.  
Hemmung der Hefe-Peptidase-Wirkung durch Glykokoll.

Substrat	pH bei Versuchsbeginn	Zeit in Min.	Acid.-Zuwachs 0.2-n. NaOH ccm
<i>o.1-m.</i> Glycyl-glycin .....	7.7	60	0.12
		185	0.34
<i>o.1-m.</i> Glycyl-glycin + <i>o.2-m.</i> Glykokoll	7.8	60	0.07
		185	0.14

<sup>12)</sup> H. v. Euler und K. Josephson, B. **59**, 226 [1926].

<sup>13)</sup> H. v. Euler und K. Josephson, Ztschr. physiol. Chem. **157**, 122 [1926].

<sup>14)</sup> In diesem und den folgenden Versuchen elektrometrisch mit Platin-Wasserstoff-Elektroden bestimmt.

kamen 5 ccm der oben beschriebenen Hefe-Erepsin-Lösung. Die Bestimmungsproben von je 5 ccm pipettierten wir in 20 ccm Methylalkohol und titrierten mit 0.2-n. alkoholischer Lauge nach R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz<sup>15)</sup> in der von E. Waldschmidt-Leitz und A. Schöffner<sup>16)</sup> angegebenen Modifikation des Verfahrens. Bei den älteren Versuchen mit der Darm-Peptidase haben wir die Formol-Titration nach S. P. L. Sørensen benutzt<sup>17)</sup>.

Zum Vergleich führen wir die folgende Versuchsreihe über die Wirkung des Glykokolls auf die Glycyl-glycin-Spaltung durch die Darm-Peptidase an. Zu jedem Versuch verwendeten wir 2 ccm Glycerin-Extrakt in 25 ccm Reaktionsmischung. Zur Formol-Titration je 5 ccm.

Tabelle 3.  
Hemmung der Darm-Peptidase-Wirkung durch Glykokoll.

Substrat	PH	Zeit in Min.	Acid.-Zuwachs 0.2-n. Ba(OH) <sub>2</sub> ccm	
0.1-m. Glycyl-glycin .....	7.9	0	—	
		50	0.50	
		65	0.65	
0.1-m. Glycyl-glycin + 0.2-m. Glykokoll	8.4	150	1.09	
		7.9	0	—
			50	0.24
8.1	65	0.29		
	150	0.52		

#### Einfluß der Acidität auf die Hemmung durch Glykokoll.

Die folgende Versuchsreihe zeigt den Einfluß der Acidität auf die Wirkung des Hefe-Erepsins bei Gegenwart von Glykokoll in der Reaktionsmischung. In ähnlicher Weise, wie wir dies früher bei Anwendung von Darm-Erepsin gefunden haben, so finden wir auch bei der Hefe-Peptidase, daß die Hemmung größer bei stärkerer Alkalinität als in der Nähe des Neutralpunktes ist.

Tabelle 4.  
Acidität und Hemmung durch Glykokoll.

In jeder Versuchsmischung von 25 ccm Totalvolumen: 0.1-m. Glycyl-glycin + NaOH, 0.2-m. Glykokoll, 5 ccm Hefe-Peptidase-Lösung. Volumen des Bestimmungsansatzes 10 ccm.

PH	Zeit in Min.	Acid.-Zuwachs ccm 0.2-n. NaOH
7.52	180	0.19
7.59	180	0.17
7.87	180	0.15
8.09	180	0.10
8.39	180	0.05
8.40	180	0.03

<sup>15)</sup> B. 54, 2988 [1921].

<sup>16)</sup> Ztschr. physiol. Chem. 151, 31 [1926].

<sup>17)</sup> Biochem. Ztschr. 7, 43 [1907], 25, 1 [1910].

Bei Gegenwart von Glykokoll in der Reaktionsmischung wird also das Optimum der Peptidase-Wirkung näher an den Neutralpunkt heranverschoben.

Die Verhältnisse bei der Hefe-Peptidase liegen also ähnlich wie bei der Darm-Peptidase. Die folgende Tabelle enthält eine Versuchsreihe mit Darm-Peptidase.

Tabelle 5.  
Acidität und Hemmung durch Glykokoll.

In jeder Versuchsmischung von 25 ccm Totalvolumen: 0.1-m. Glycyl-glycin + NaOH, 0.2-m. Glykokoll, 2 ccm des im Verhältnis 1 : 2 verd. Glycerin-Extraktes. Volumen des Bestimmungs-Ansatzes 5 ccm.

PH	Zunahme des Alkaliverbrauchs nach		
	70 Min.	180 Min.	280 Min.
7.09	0.30	0.63	0.76
7.61	0.25	0.46	0.52
7.87	0.21	0.44	—
8.16	0.11	0.25	—
8.44	0.00	0.02	—

Hemmung der Glycyl-glycin-Spaltung durch  $\alpha$ -Alanin.

Das  $\alpha$ -Alanin hat eine ähnliche Wirkung auf die Peptidase wie Glykokoll. Dieser Satz, welchen wir schon früher hinsichtlich der Darm-Peptidase ausgesprochen haben, scheint auch für die Hefe-Peptidase Gültigkeit zu besitzen. Die folgende Tabelle zeigt, daß die Hemmung der Hefe-Peptidase-Wirkung durch die besprochene Amino-säure von ähnlicher Größenordnung ist, wie die Hemmung durch Glykokoll bei der optimalen Acidität der Enzym-Wirkung ohne Gegenwart von hemmenden Amino-säuren.

Tabelle 6.

Hemmung der Hefe-Peptidase-Wirkung durch  $\alpha$ -Alanin.

5 ccm Hefe-Peptidase-Lösung in 25 ccm Reaktionsmischung.  $p_H = 7.7$ . Volumen des Bestimmungs-Ansatzes 10 ccm.

Substrat	Zeit in Min.	Acid.-Zuwachs ccm 0.2-n. NaOH
0.1-m. Glycyl-glycin .....	180	0.65
0.1-m. Glycyl-glycin + 0.1-m. $\alpha$ -Alanin ....	180	0.42

Bei der Hefe-Peptidase war also die Hemmung durch Alanin und durch Glykokoll nahezu gleich groß. Bei der Darm-Peptidase haben wir früher eine etwas größere Hemmung durch  $\alpha$ -Alanin als durch Glykokoll gefunden. Früher an anderer Stelle beschriebene Versuche zeigten, daß der Einfluß der Acidität auf die Hemmung der Darm-Peptidase-Wirkung durch Alanin von ganz ähnlicher Art wie bei Glykokoll ist.

Verhalten der beiden Peptidasen zu Benzoyl-glycyl-glycin.

Die Unspaltbarkeit des benzoilylierten Glycyl-glycins durch die Peptidase aus Schweinedarm hat schon T. Imai nachgewiesen; den Befund dieses Forschers konnten wir bestätigen. Die Prüfung des Verhaltens der Hefe-

Peptidase zu dem Benzoyl-glycyl-glycin<sup>18)</sup> hat nun ergeben, daß auch diese Peptidase das Benzoyl-glycyl-glycin nicht zu spalten vermag.

Tabelle 7.

Prüfung der Unspaltbarkeit des Benzoyl-glycyl-glycins durch Hefe-Peptidase.

0.1-m. Benzoyl-glycyl-glycin, 5 ccm Hefe-Peptidase-Lösung in 25 ccm Reaktionsmischung. Volumen des Bestimmungs-Ansatzes 5 ccm.

PH = 7.23		PH = 7.87	
Zeit in Stdn.	verbrauchte ccm 0.2-n. NaOH	Zeit in Stdn.	verbrauchte ccm 0.2-n. NaOH
0	0.22	0	0.17
1	0.23	4	0.16
17	0.22	24	0.23
66	0.23	70	0.18

Spaltung der Biuretbase  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CO}[\text{NH}\cdot\text{CH}_2\text{CO}]_2\text{NH}\cdot\text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$  durch Hefe- und Darm-Peptidase.

Die Biuretbase haben wir nach den von Th. Curtius<sup>19)</sup> angegebenen Vorschriften durch Kondensation des reinen Glykokoll-esters in trockner Äther-Lösung dargestellt. Zur Einstellung der optimalen Acidität der Peptidase-Wirkung haben wir zu der alkalischen Lösung der Biuretbase Salzsäure bis zur neutralen Reaktion zugegeben und dann durch Zusatz von geringen Mengen Natronlauge die erwünschte Acidität erreicht.

Wie schon früher bei Prüfung der Spaltbarkeit der Biuretbase durch die Darm-Peptidase bemerkt wurde, bekundet sich die Spaltbarkeit der Base außer durch Änderung des Alkali-Verbrauchs bei der Formol-Titration oder Titration in alkoholischer Lösung auch durch die Änderung der Acidität. Diese Aciditäts-Änderung geht von stärkerer Alkalinität zu stärkerer Acidität, verläuft also in der umgekehrten Richtung wie bei der Spaltung des Glycyl-glycins.

Tabelle 8.

Spaltung der Biuretbase durch Hefe-Peptidase.

0.1-m Biuretbase. 5 ccm Hefe-Peptidase-Lösung in 25 ccm Reaktionsmischung. Volumen des Bestimmungs-Ansatzes 5 ccm.

Zeit in Stdn.	PH	Acid.-Zuwachs ccm 0.2-n. NaOH
0	7.97	—
16	7.28	2.86
22	—	3.21
64	6.0	4.25

<sup>18)</sup> Das Präparat von Benzoyl-glycin-glycin, welches den Schmp. 208° hatte, haben wir nach der von E. Fischer, B. 38, 608 [1905], angegebenen Methode dargestellt.

<sup>19)</sup> B. 37, 1284 [1904].



Tabelle 9.

Spaltung der Biuretbase durch Darm-Peptidase.

0.1-m. Biuretbase. 2 ccm Darm-Peptidase-Lösung in 25 ccm Reaktionsmischung. Volumen des Bestimmungs-Ansatzes 5 ccm. Formol-Titration mit 0.209-n. Ba(OH)<sub>2</sub>.

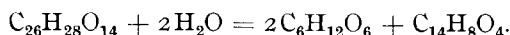
Versuch A			Versuch B		
Zeit in Stdn.	PH	ccm Ba(OH) <sub>2</sub>	Zeit in Stdn.	PH	ccm Ba(OH) <sub>2</sub>
0	8.37	—	0	8.35	—
2	—	0.10	4	—	0.25
6.5	8.1	0.50	20	7.8	1.03

## 242. Erhard Glaser und Oscar Kahler: Zur Kenntnis der Rubierythrinsäure.

[Aus d. Chem. Laborat. d. Pharmakognost. Instituts d. Universität Wien.]

(Eingegangen am 7. Mai 1927.)

In der *Rubia tinctorum*, welche früher bei der englischen Krankheit innerlich verabreicht, andererseits zur Erzeugung der als Türkischrot bekannten, waschechten und lichtbeständigen Farbe verwendet wurde, ist das Glucosid Rubierythrinsäure enthalten, welches von Schunk<sup>1)</sup> und Rochleder<sup>2)</sup> zuerst dargestellt und von Perkin und Hummel<sup>3)</sup> auch in der Wurzel von *Oldenlandia umbellata* aufgefunden wurde. Die Rubierythrinsäure wird von denselben als gelbe, seidenglänzende Prismen vom Schmp. 258—260° beschrieben, welche wenig in kaltem, leicht in heißem Wasser und Alkohol, schwer in Äther und Benzol löslich sind. Ätzalkalien lösen sie mit dunkelroter Farbe. Beim Kochen mit verd. Salzsäure oder Alkalien bzw. bei der Einwirkung von Fermenten zerfallen sie nach Graebe und Liebermann<sup>4)</sup> in Glucose und Alizarin:



Doch scheinen bezüglich der Konstitution schon Liebermann und Bergami<sup>5)</sup>, welche dieselbe genauer untersuchten, Bedenken in der Hinsicht gehabt zu haben, daß beide Alizarin-Hydroxylreste durch Traubenzucker ersetzt sind. Dagegen wurde angeführt, daß die Rubierythrinsäure eine verhältnismäßig starke einbasische Säure ist, welche nicht allein mit Carbonaten der Alkalien, mit Ammoniak, mit alkalischen Erden sofort Salze bildet, sondern sogar Lösungen essigsaurer Alkalien zerlegt. Im übrigen ist bei ihr im allgemeinen nur ein Hydroxyl-Wasserstoff durch Metalle ersetzbar, und es gleichen die Salze der Rubierythrinsäure äußerlich durchaus den charakteristischen Salzen der zucker-freien Farbstoffe der Dioxy-anthraquinon-Gruppe, bei denen die Salz-Bildung auf den Phenol-Hydroxylen beruht.

<sup>1)</sup> Schunk, A. **66**, 176; Jahresber. Chem. **1855**, 666.

<sup>2)</sup> Rochleder, A. **80**, 324.

<sup>3)</sup> Perkin, Hummel, Journ. chem. Soc. London **63**, 1180.

<sup>4)</sup> Graebe und Liebermann, A. Suppl. **7**, 296.

<sup>5)</sup> Liebermann und Bergami, B. **20**, 2241 [1887].