

Hier war die Verharzung schon bei 40° sehr bedeutend und noch viel stärker bei 100°, wie man leicht an dem starken Sinken der K-Werte bemerken kann. Als Produkt der Reaktion konnte nach Verseifung bei 18° in 50 Stdn. 1.8-Dinitro-4-naphthol (Schmp. 208°) isoliert werden. Die Verseifung läßt sich auch durch Kochen mit wäßriger Natronlauge (20-proz.) ausführen. In 3 Stdn. wurden 29.11% des Dinitro-brom-naphthalins verseift; auch hier wurde 1.8-Dinitro-4-naphthol erhalten.

Mit Piperidin wurde die Reaktion ebenfalls wie bei den Nitro-brom-naphthalinen durchgeführt.

0.2238 g Subst. erforderten 13.8 ccm Silbernitrat-Lösung (Titer, auf Brom bezogen, 0.00420), woraus sich die Menge der umgesetzten Substanz zu 96.22% berechnet.

Hier tritt die Reaktion schon bei niedrigeren Temperaturen leicht ein: bei 18° sind in 72 Stdn. 89.07% der Substanz umgesetzt worden (0.2226 g Subst. erforderten 12.76 ccm Silbernitrat-Lösung).

Leningrad, 30. November 1930.

#### 43. Arnold K. Balls und Franz Köhler: Über die Wirkungsweise der Peptidasen (XXII. Mitteil. zur Spezifität tierischer Proteasen, in der von E. Waldschmidt-Leitz und Mitarbeitern begonnenen Untersuchungsreihe).

[Aus d. Institut für Biochemie d. Deutsch. Techn. Hochschule in Prag.]  
(Eingegangen am 20. Dezember 1930.)

Kürzlich haben wir über die Wirkungsweise der Dipeptidase berichtet<sup>1)</sup>. Wir konnten zeigen, daß das Substrat mit zwei Haftstellen an das Enzym gebunden wird, so wie es schon H. v. Euler und K. Josephson<sup>2)</sup> in der „Zwei-Affinitäts-Theorie“ angedeutet haben. Als die reaktionsfähige Gruppe haben E. Waldschmidt-Leitz und Mitarbeiter<sup>3)</sup>, sowie H. v. Euler<sup>4)</sup> die freie Amino-Gruppe des Dipeptids bezeichnet. Als zweite Haftstelle für das Enzym konnten wir, auf Grund des Verhaltens von sog. Anilin-Peptiden, Peptiden aus Amino-säuren und substituiertem Anilin, die Imino-Gruppe des Peptids feststellen.

Wenn die Imino-Gruppe tatsächlich als zweite Haftstelle fungiert, so müssen Körper, die zwar eine Peptid-Bindung, aber keine freie Amino-Gruppe besitzen, imstande sein, die Enzym-Wirkung zu hemmen. Am Beispiel des Chloracetyl-tyrosins und der Acetursäure konnten wir in der voraufgegangenen Arbeit zeigen, daß tatsächlich die Imino-Gruppe die erwartete Hemmungs-Erscheinung hervorruft.

Die Reaktionsfähigkeit mit zwei aktiven Gruppen des Substrat-Moleküls, wie sie der Dipeptidase zukommt, ist indes nicht nur auf dieses Enzym beschränkt; A. K. Balls konnte auch an der Carboxy-Polypeptidase des Pankreas ähnliche Hemmungs-Erscheinungen feststellen, die eine Verbindung

<sup>1)</sup> A. K. Balls u. F. Köhler, B. 64, 34 [1931].

<sup>2)</sup> H. v. Euler u. K. Josephson, Ztschr. physiol. Chem. 133, 279 [1923/24]; K. Josephson u. H. v. Euler, Ztschr. physiol. Chem. 162, 85 [1926].

<sup>3)</sup> E. Waldschmidt-Leitz, W. Graßmann u. A. Schöffner, B. 60, 359 [1927].

<sup>4)</sup> H. v. Euler u. K. Josephson, Ztschr. physiol. Chem. 157, 122 [1926].

des Enzyms an einer zweiten Haftstelle beweisen<sup>5)</sup>. Es scheint so, daß die Imino-Gruppe der Peptid-Bindung, gegenüber allen bisher näher gekennzeichneten Peptidasen, eine gemeinsame Wirkung ausübt<sup>6)</sup>.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit dem Reaktions-Mechanismus der Amino-Polypeptidase des Darms. Es hat sich gezeigt, daß auch die Wirkung der Amino-Polypeptidase durch Verbindungen, die eine Imino-Gruppe besitzen, weitgehend gehemmt wird. Und zwar ruft nur diejenige Imino-Gruppe, die an eine saure Gruppe gebunden ist, eine Hemmungs-Erscheinung hervor.

Tabelle I.

Beobachtung der Hemmung an Amino-Polypeptidase.

Substanz	Hemmung
Benzoyl-glycin .....	+
[Brom-isocapronyl]-glycin .....	+
[ <i>p</i> -Nitro-benzoyl]-glycin .....	+
Acetursäure .....	+
Phthalamid .....	+
Sarkosin .....	+
Allantoin .....	—
Kreatinin .....	—
Glycin-anhydrid .....	—

(Die Zeichen bedeuten: + = Hemmung; — = keine Hemmung.)

Deshalb hemmen, wie aus der Tabelle I zu ersehen ist, Benzoyl-, [Brom-isocapronyl]-, [*p*-Nitro-benzoyl]-glycin. Substanzen dagegen, die keinen Säure-Rest in direkter Bindung mit der Imino-Gruppe haben, wie beispielsweise Kreatinin und Allantoin, hemmen nicht. Auch Glycin-anhydrid, in welchem — wie wir glauben — der saure Charakter durch Ringbildung abgesättigt ist, verhält sich analog. Die Tatsache unterstützt in auffallender Weise die Ansicht, daß die Reaktionsfähigkeit der Imino-Gruppe abhängig ist von ihrem sauren Charakter.

Dasselbe ergibt sich aus dem Verhalten von Di- und Amino-Polypeptidase gegenüber substituierten Di- und Tri-peptiden. Es übt nämlich nur die eine, dem Säure-Rest benachbarte Peptid-Bindung eine hemmende Wirkung aus. Äquivalente Mengen von [Brom-isocapronyl]-glycin, -diglycin und -triglycin ergeben die nämliche Hemmung. Wird aber weiterhin in das Peptid-Molekül eine saure Gruppe, beispielsweise Tyrosin, eingeführt, so wird eine bedeutend erhöhte Hemmung beobachtet; denn jetzt ist mehr als eine Imino-Gruppe befähigt, mit dem Enzym in Reaktion zu treten. Die Imino-Gruppe, die der Carboxyl-Gruppe im [Brom-isocapronyl]-triglycin benachbart ist, kann mit dem Enzym nicht reagieren, während die nämliche Imino-Gruppe im [Brom-isocapronyl]-triglycyl-tyrosin offenbar eine größere Reaktionsfähigkeit aufweist. An diesem Beispiel läßt sich erklären, daß die Carboxy-Polypeptidase nur solche Peptide zu spalten vermag, deren Peptid-Bindung einer stark sauren Gruppe benachbart ist.

Die Spaltung von natürlichen Peptiden, wie z. B. Glycyl-glycin, kann dann vielleicht so erklärt werden, daß die Carboxyl-Gruppe auf die Imino-

<sup>5)</sup> A. K. Balls, Habilitations-Schrift, Prag 1930.

<sup>6)</sup> vergl. E. Stiasny u. H. Scotti, B. 63, 2977 [1930].

Gruppe einen für den Eintritt der Enzym-Reaktion notwendigen aktivierenden Einfluß ausübt. Die Hemmung der Amino-Polypeptidase-Wirkung durch Sarkosin, das keine freie Amino-Gruppe, aber eine Imino-Gruppe besitzt, scheint diese Anschauung zu bestätigen. Indes würde dadurch die Spaltung eines Tripeptids nicht zu erklären sein; denn in diesem Falle dürfte der aktivierende Einfluß der Carboxyl-Gruppe auf die der Spaltung anheimfallende Peptid-Bindung keinen nennenswerten Einfluß haben. Viel wahrscheinlicher ist es, daß die notwendige Aktivierung der Imino-Gruppe durch das Enzym selbst hervorgerufen wird. Die Ansicht, daß die Verbindung des Enzyms mit der Amino-Gruppe des Peptid-Moleküls erst die Imino-Gruppe befähigt, als zweite Haftstelle zu fungieren, scheint uns der Diskussion wert. Darnach würde durch den Eintritt des Enzyms in die Amino-Gruppe deren basischer Charakter so weit abgesättigt, als zur Aktivierung der Imino-Gruppe notwendig ist. Die Zerfalls-Neigung dieser Enzym-Substrat-Verbindung ist nach unserer Ansicht nicht in einer erhöhten Instabilität gegenüber der Wasserstoff-Ionen-Konzentration zu suchen, sondern in einer erhöhten Reaktionsfähigkeit der Imino-Gruppe. Daß die zweite Haftstelle tatsächlich in der Imino-Gruppe zu suchen ist, beweist die Aufhebung der Hemmung, die man durch Substitution des Imino-Wasserstoffs erzielen kann. So übt Benzoyl-glycin eine starke Hemmung aus, während Benzoyl-sarkosin ohne Einfluß auf die Spaltungs-Geschwindigkeit des Substrats ist.

Die Hemmungs-Reaktionen an Dipeptidase und Amino-Polypeptidase sind reversibel. Die Konkurrenz zwischen Hemmungs-Körper und Substrat führt zu einem Gleichgewicht, das von dem Verhältnis der Konzentrationen beider abhängig ist. Denn die Erhöhung der Konzentration des Hemmungs-Körpers vermindert die Spaltung, die des Substrats erhöht sie; während die Veränderung der Enzym-Konzentration bei Konstanz von Hemmungs-Körper- und Substrat-Konzentration, ähnlich wie im Falle, wo zwei schwache Säuren um eine starke Base konkurrieren, keine Verschiebung des Verhältnisses  $\frac{\text{Enzym-Substrat-Verbindung}}{\text{Enzym-Hemmungskörper-Verbindung}}$  hervorruft.

Dipeptidase und Amino-Polypeptidase gehen mit dem Imino-Wasserstoff dieselbe Reaktion ein; die Wirkung beider Enzyme wird durch dieselben Hemmungs-Körper herabgesetzt. Es läßt sich zeigen, daß Dipeptidase und Amino-Polypeptidase zusammen um den nämlichen Hemmungs-Körper konkurrieren. Die Hemmung der Dipeptidase, z. B. durch Benzoyl-glycin, kann durch Amino-Polypeptidase aufgehoben werden.

Es scheint uns wichtig, daß die oben beschriebenen Tatsachen eine bemerkenswerte Stütze für die Theorien bilden, daß die Imino-Gruppe als Haftstelle für alle Peptidasen fungiert. Damit ist zum erstenmal ein gemeinsames Prinzip der Wirkungsweise von Peptidasen aufgefunden. Die eine der mit dem Enzym reagierenden Gruppen des Substrat-Moleküls ist für die Dipeptidase, Amino-Polypeptidase, wie auch für die Carboxy-Polypeptidase die nämliche: die Imino-Gruppe. Unterschieden sind nach den bisherigen Ergebnissen die ereptischen Enzyme von der Carboxy-Polypeptidase in der Reaktions-Fähigkeit mit der zweiten aktiven Gruppe des Substrats, die in dem einen Falle die Amino-, in dem anderen Falle die Carboxyl-Gruppe ist. Ein unterscheidendes Merkmal in der Wirkungs-Weise der Dipeptidase gegenüber der Amino-Polypeptidase ist in bezug auf die zwei Haftstellen nicht fest-

zustellen. Beide Enzyme binden sich, wie aus den mitgeteilten Befunden ersichtlich ist, an die Amino- und an die Imino-Gruppe des Peptids. Vielleicht bietet indessen die Tatsache, daß Dipeptidase durch Amino-säuren gehemmt wird, Amino-Polypeptidase dagegen nicht, einen Hinweis auf die Verschiedenheit des Reaktions-Mechanismus der beiden Enzyme. Dieser Befund deutet nämlich darauf hin, daß der Eintritt der Reaktion zwischen einer Peptidase und der Amino-Gruppe eines Peptids von dem elektrochemischen Charakter der Amino-Gruppe abhängig ist: denn nur die Amino-Gruppe der Polypeptide hat einen für die Anlagerung der Amino-Polypeptidase genügend basischen Charakter.

Die Ursache der Spezifitäts-Unterschiede zwischen Di- und Polypeptidase in Zusammenhang mit der Erscheinung der sterischen Spezifität eingehender kennen zu lernen, wird unsere nächste Aufgabe sein.

### Beschreibung der Versuche.

#### Darstellung der Enzyme.

Erepsin wurde aus Darm-Schleimhaut nach der Methode von Waldschmidt-Leitz und Schöffner dargestellt. Nach der Adsorption an Tonerde wurde sehr gut gewaschen und mit  $n_{18}$ -Ammoniak (20% Glycerin enthaltend) eluiert, neutralisiert und durch Kieselgur abfiltriert.

Amino-Polypeptidase wurde nach Waldschmidt-Leitz und Balls durch Behandlung mit gealtertem Eisenhydroxyd dargestellt und die so gewonnene Restlösung einer weiteren Reinigung unterworfen. Zu diesem Zwecke wurde die Amino-Polypeptidase-Lösung auf  $-5^{\circ}$  bis  $-10^{\circ}$  abgekühlt und mit dem gleichen Volumen gekühltem Aceton gefällt. Die entstandene geringe Trübung wurde mit Kieselgur abfiltriert, mit eis-gekühltem Aceton gut gewaschen und in 20-proz. Glycerin suspendiert. Abermals von der Kieselgur abfiltriert. Im Filtrat befindet sich die Amino-Polypeptidase, die eine 10-mal größere Reinheit aufweist, als die ursprüngliche Eisenhydroxyd-Restlösung. Über das Verhalten dieser so gereinigten Amino-Polypeptidase werden wir später berichten.

Darstellung von Benzoyl-sarkosin: 2 g Sarkosin wurden in 20 ccm Wasser gelöst, mit 22.5 ccm  $n_{11}$ -NaOH versetzt, auf  $5^{\circ}$  abgekühlt und mit 6.1 g Benzoylchlorid (gelöst in 20 ccm Äther) und 53.0 ccm  $n_{11}$ -NaOH abwechselnd in 4 Portionen zugegeben (Dauer 30 Min.). Die Lösung wurde mit 5-n. HCl gegen Kongorot schwach angesäuert und im Vakuum bis zur Sirup-Konsistenz eingedampft. Nun wurde in 100 ccm heißem Aceton aufgenommen, abfiltriert, auf 15 ccm eingedampft und mit 30 Tln. Petroläther gefällt. Das ausfallende Öl wurde mehrmals mit Petroläther behandelt, im Vakuum über  $P_2O_5$  getrocknet, abermals in Äther gelöst, abfiltriert und mit Petroläther gefällt. Aus dem ausgeschiedenen Öl krystallisiert das Produkt, nach längerem Stehen, in schönen, langen Nadeln. Ausbeute: 1.3 g.

158 mg Sbst.: 4.1 ccm  $n_{18}$ -KOH (alkohol. Titration, Phenol-phthalein); ber. für  $C_{10}H_{11}O_3N$  4.09 ccm. — 7.968 mg Sbst.: 2.9 ccm  $n_{70}$ - $H_2SO_4$  (Pregl) = 0.58 mg N = 7.27% N, ber. 7.25% N.

#### Hemmungs-Versuche:

Um bei den Hemmungs-Versuchen vergleichbare Resultate zu erhalten, ist die Reinheit von Enzym und Substrat besonders wichtig. Leucyl-glycin und Leucyl-diglycin wurden einigemal aus verd. Alkohol umkrystallisiert.

Die Hemmungs-Versuche wurden folgendermaßen durchgeführt: der Hemmungs-Körper wurde in NaOH gelöst, das  $p_H$  auf 8.0 eingestellt und mit Substrat und Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer versetzt. Schließlich wurde das Enzym zugesetzt. Das  $p_H$  dieser Lösung beträgt 8.0. Die in den

Tabellen stehenden Zahlen beziehen sich auf ein Volumen von 5 ccm, das zur alkohol. Titration nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz verwendet wurde.

Tabelle II.

Wirkung verschiedener Hemmungs-Körper auf Amino-Polypeptidase.

Hemmungs-Substanz	Mol. pro Titrat.	Pol. (e.)	Mol. Substrat pro Titrat.	Mol. Puffer	Zeit Min.	Aciditäts-Zuwachs ccm $n/6$ -Lauge
—	—	0.0148	0.0005	0.001	60	0.89
Benzoyl-glycin . . . . .	0.0005	0.0148	0.0005	0.001	60	0.24
—	—	0.00858	0.0005	0.001	90	0.80
[Brom-isocapronyl]-glycin	0.0005	0.00858	0.0005	0.001	90	0.42
—	—	0.0078	0.0005	0.001	125	0.77
[p-Nitro-benzoyl]-glycin..	0.0005	0.0078	0.0005	0.001	125	0.43
—	—	0.0091	0.0005	0.001	120	0.96
Acetursäure . . . . .	0.0005	0.0091	0.0005	0.001	120	0.68
—	—	0.00858	0.0005	0.001	90	0.80
Phthalimid . . . . .	0.0005	0.00858	0.0005	0.001	90	0.42
Sarkosin . . . . .	0.0005	0.00858	0.0005	0.001	90	0.52
—	—	0.00858	0.0005	0.001	90	0.73
Allantoin . . . . .	0.0005	0.00858	0.0005	0.001	90	0.74
Kreatinin . . . . .	0.0005	0.00858	0.0005	0.001	90	0.68
—	—	0.00858	0.0005	0.001	90	0.81
Glycin-anhydrid . . . . .	0.0005	0.00858	0.0005	0.001	90	0.82

Tabelle III.

Vergleichende Hemmungs-Wirkung an Dipeptidase.

Hemmungs-Körper	Mol. pro Titrat.	Di. (e.)	Mol. Substrat pro Titrat.	Mol. Puffer	Zeit Min.	Aciditäts-Zuwachs ccm $n/6$ -Lauge
—	—	0.00030	0.0005	0.001	180	0.54
Benzoyl-glycin . . . . .	0.00075	0.00030	0.0005	0.001	180	0.27
Benzoyl-diglycin . . . . .	0.00075	0.00030	0.0005	0.001	180	0.28

Tabelle IV.

Vergleichende Hemmungs-Wirkung an Amino-Polypeptidase.

Hemmungs-Körper	Mol. pro Titrat.	Pol. (e.)	Mol. Substrat pro Titrat.	Mol. Puffer	Zeit Min.	Aciditäts-Zuwachs ccm $n/6$ -Lauge
—	—	0.00858	0.0005	0.001	90	0.80
[Brom-isocapronyl]-glycin	0.0005	0.00858	0.0005	0.001	90	0.42
[Brom-isocapronyl]-diglycin . . . . .	0.0005	0.00858	0.0005	0.001	90	0.44
[Brom-isocapronyl]-triglycin . . . . .	0.0005	0.00858	0.0005	0.001	90	0.44
—	—	0.0148	0.0005	0.001	60	0.89
Benzoyl-glycin . . . . .	0.0005	0.0148	0.0005	0.001	60	0.24
Benzoyl-diglycin . . . . .	0.0005	0.0148	0.0005	0.001	60	0.28
Benzoyl-triglycin . . . . .	0.0005	0.0148	0.0005	0.001	60	0.21

Tabelle V.

Hemmung der Amino-Polypeptidase durch Benzoyl-glycin, bei wechselnder Substrat-Konzentration.

Mol Benzoyl-glycin pro Titrat.	Mol. Substrat pro Titrat.	Pol. (e.)	Mol. Puffer	Zeit Min.	Aciditäts-Zuwachs ccm $n/30$ -Lauge
—	0.00025	0.0092	0.001	30	1.28
0.00025	0.00025	0.0092	0.001	30	0.37
—	0.0005	0.0092	0.001	30	1.33
0.00025	0.0005	0.0092	0.001	30	0.41
—	0.001	0.0092	0.001	30	1.33
0.00025	0.001	0.0092	0.001	30	0.36
—	0.002	0.0092	0.001	30	1.38
0.00025	0.002	0.0092	0.001	30	1.00
0.00025	0.00025	0.0092	0.001	950	2.14
0.00025	0.00025	0.0092	0.001	1260	4.13

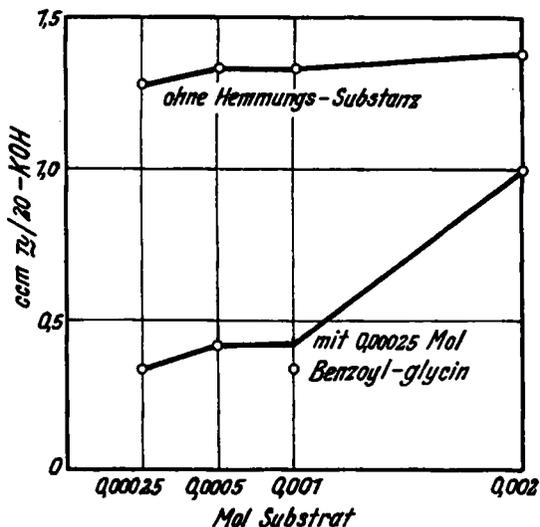


Tabelle VI.

Hemmung der Amino-Polypeptidase durch Benzoyl-glycin, bei wechselnder Enzym-Konzentration.

Mol. Benzoyl-glycin pro Titrat.	Mol. Substrat pro Titrat.	Pol. (e.)	Mol. Puffer	Zeit Min.	Aciditäts-Zuwachs ccm $n/6$ -Lauge
—	0.0005	0.014	0.001	60	0.84
0.001	0.0005	0.042	0.001	20	0.26
0.001	0.0005	0.028	0.001	30	0.26
0.001	0.0005	0.014	0.001	60	0.22
0.001	0.0005	0.007	0.001	120	0.22

Tabelle VII.

Hemmung der Dipeptidase durch Benzoyl-glycin, bei wechselnder Enzym-Konzentration.

Mol. Benzoyl-glycin pro Titrat.	Mol. Substrat pro Titrat.	Di. (e.)	Mol. Puffer	Zeit Min.	Aciditäts-Zuwachs ccm $n/5$ -Lauge
—	0.0005	0.0033	0.001	60	0.92
0.001	0.0005	0.0033	0.001	60	0.33
0.001	0.0005	0.0066	0.001	30	0.52
0.001	0.0005	0.0132	0.001	15	0.52
0.001	0.0005	0.0198	0.001	10	0.55

Tabelle VIII.

Aufhebung der Hemmung von Benzoyl-glycin an Dipeptidase, mit Amino-Polypeptidase.

Pol. (e.)	Di. (e.)	Leucyl-glycin Mol. pro Titrat.	Mol. Puffer	Mol. Benzoyl-glycin	Zeit Min.	Aciditäts-Zuwachs ccm $n/5$ -Lauge
—	0.00033	0.0005	0.001	—	180	0.68
—	0.00033	0.0005	0.001	0.0005	180	0.25
0.00715	0.00033	0.0005	0.001	0.0005	180	0.41
0.0143	0.00033	0.0005	0.001	0.0005	180	0.47
0.0286	0.00033	0.0005	0.001	0.0005	180	0.49

Tabelle IX.

Verhalten von Benzoyl-sarkosin gegenüber Dipeptidase und Amino-Polypeptidase.

Pol. (e.)	Di. (e.)	Mol. Substrat pro Titrat.	Mol. Puffer	Mol. Benzoyl-sarkosin	Zeit Min.	Aciditäts-Zuwachs ccm $n/5$ -Lauge
0.0142	—	0.0005	0.001	—	60	0.83
0.0142	—	0.0005	0.001	0.0005	60	0.78
—	0.0025	0.0005	0.001	—	60	0.73
—	0.0025	0.0005	0.001	0.0005	60	0.73

Tabelle X.

Verhalten einiger Amino-säuren gegen Amino-Polypeptidase<sup>7)</sup>.

Amino-säure	Mol. Amino-säure pro Titrat.	Pol. (e.)	Mol. Substrat pro Titrat.	Mol. Puffer	Zeit Min.	Aciditäts-Zuwachs ccm $n/5$ -Lauge
Glykokoll . . . .	0.001	0.0071	0.0005	0.001	120	0.86
$\alpha$ -Alanin . . . .	0.001	0.0071	0.0005	0.001	120	0.85
<i>l</i> -Leucin . . . . .	0.001	0.0071	0.0005	0.001	120	0.84
<i>d</i> -Glutaminsäure	0.001	0.0071	0.0005	0.001	120	0.85
—	—	0.0071	0.0005	0.001	120	0.86

<sup>7)</sup> W. Graßmann, Habilitations-Schrift, München (1928), hat gefunden, daß die Hefe-Polypeptidase-Wirkung auf Triglycin durch *l*-Leucin gehemmt wird. Die Spaltung anderer Peptide wird dagegen durch *l*-Leucin nicht beeinflusst. E. Abderhalden u. O. Hermann, Ferment-Forsch. 10, 610 [1928], finden keine hemmende Wirkung von Glykokoll auf Dipeptid-Spaltung (mit Erepsin), dagegen eine schwache Hemmung der Spaltung von *d,l*-Leucyl-glycyl-*d,l*-leucin. Daß bei schwer spaltbaren Substraten die Amino-säuren eine schwache Hemmung ausüben können, also eine geringe Affinität zur Amino-Polypeptidase haben dürften, scheint uns der obigen Ansicht nicht zu widersprechen. Die geringe, aber deutliche Spaltbarkeit der Glycyl-*p*-amino-benzoessäure durch Amino-Polypeptidase zeigt, daß nicht alle Dipeptide unangegriffen von Amino-Polypeptidase bleiben.

Tabelle XI.

Verhalten einiger Amino-säuren gegen Dipeptidase <sup>1)</sup>.

Amino-säure	Mol. Amino-säure pro Titrat.	Di. (c.)	Mol. Substrat pro Titrat.	Mol. Puffer	Zeit Min.	Aciditäts-Zuwachs ccm $n/5$ -Lauge
Glykokoll . . . .	0.001	0.0013	0.0005	0.001	120	0.50
$\alpha$ -Alanin . . . .	0.001	0.0013	0.0005	0.001	120	0.50
$d$ -Glutaminsäure	0.001	0.0013	0.0005	0.001	120	0.38
—	—	0.0013	0.0005	0.001	120	0.77

Der Deutschen Forschungs-Gemeinschaft danken wir ergebenst für die zur Verfügung gestellten Mittel.

#### 44. Paul Baumgarten und Ilse Marggraff: Zur Kenntnis der Carbamido-sulfonsäuren.

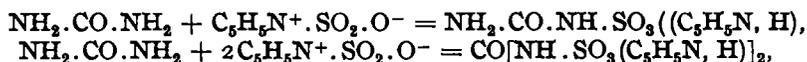
[Aus d. Chem. Institut d. Universität Berlin.]

(Eingegangen am 20. Dezember 1930.)

Sulfonsäuren des Harnstoffs, des Carbamids, konnten bisher nicht dargestellt werden. Die Mittel, der man sich für gewöhnlich bei der Einführung von Sulfogruppen in Verbindungen bedient, versagten im Falle der Sulfonierung des Harnstoffs. Doch gelingt es ohne weiteres, unter Zuhilfenahme der aus Pyridin und Schwefeltrioxyd, Chlorsulfonsäure oder deren Estern entstehenden *N*-Pyridinium-sulfonsäure<sup>1)</sup> der Formel  $C_5H_5N^+ \cdot SO_2 \cdot O^-$ , Schwefeltrioxyd auf Harnstoff zu übertragen und Carbamido-sulfonsäuren zu erhalten.

Carbamid vermag bei Monosubstitution seiner Amidogruppen zwei Sulfonsäuren zu bilden: eine Carbamido-monosulfonsäure,  $H_2N \cdot CO \cdot NH \cdot SO_3H$  (I), und eine Carbamido-disulfonsäure,  $CO(NH \cdot SO_3H)_2$  (II).

Zur Gewinnung der Monosulfonsäure wird man ein Mol. und zur Darstellung der Disulfonsäure zwei Mol. Schwefeltrioxyd auf ein Mol. Harnstoff übertragen müssen, d. h. man muß auf ein Mol. Harnstoff ein Mol. bzw. zwei Mol. *N*-Pyridinium-sulfonsäure einwirken lassen. Zu diesem Zwecke wird ein Gemisch aus Harnstoff und *N*-Pyridinium-sulfonsäure bei einer geeigneten Temperatur verschmolzen. Es tritt hierbei sofort Reaktion ein, und nach den Gleichungen:



entstehen als Reaktionsprodukte das Pyridiniumsalz der Carbamido-monosulfonsäure bzw. das der Carbamido-disulfonsäure. Diese Pyridiniumsalze sind gut kristallisierende Stoffe. Aus ihnen sind die anderen Salze der beiden Säuren leicht zugänglich. So erhält man die Alkali- oder Erdalkalisalze durch Umsetzung der Pyridiniumsalze mit den berechneten Mengen Alkali- oder Erdalkalihydroxyd in wäßriger Lösung.

<sup>1)</sup> P. Baumgarten, B. 59, 1166, 1976 [1926].