

Der Versuch, das Mol.-Gewicht nach der Campher-Methode von Rast festzustellen, war erfolglos, da beim Zusammenschmelzen, welches bei höherer Temperatur eintritt, Schwarzfärbung infolge Zersetzung stattfand. Dem dennoch nach dieser Methode bestimmten Mol.-Gewicht von 2351 kann jedenfalls keine reale Bedeutung zugeschrieben werden (Depr. 1.65° bei 0.0388 g Substanz und 0.3950 g Campher).

Auf Grund der angeführten Molgew.-Bestimmungen müssen die Individualgruppen in unseren Präparaten dem Mol.-Werte 288, somit der einfachen Formel $C_6H_7O_5(CH_3.CO)_3$ entsprechen. Selbstverständlich konnte die Differenz zwischen Hexose- und beigemengten Pentose-Gruppen wegen der nur geringen Menge der letzteren keinen entscheidenden Einfluß auf die Resultate der Analysen-Zahlen ausüben.

Zur Regeneration des ursprünglichen Kohlehydrats wurden die Acetylverbindungen der drei Fraktionen durch mehrtägiges Stehenlassen bei Zimmer-Temperatur mit 0.5-n. alkohol. Kalilauge verseift. Die Resultate der Untersuchung der regenerierten Körper sind in Tabelle V zusammengestellt.

Tabelle V: Regeneriertes Kohlehydrat.

	Kali-Gehalt %	% C ?)	% H ?)	$[\alpha]_D$ in 4-proz. NaOH ?)
I.	3.14	44.85	5.97	+232.2
II.	5.60	44.74	5.89	+232
III.	—	44.78	6.81	92.7
Berechnet für $C_6H_{10}O_5$	—	44.44	6.17	—

I. 0.0285 g Stbst. nach H_2SO_4 -Behandlung der Asche: 0.0020 g K_2SO_4 . — 3.154 mg Stbst.: 5.187 mg CO_2 , 1.169 mg H_2O . — $[\alpha]_D = +2.65^\circ \times 100/2.2 \times 0.5188$.

II. 0.0138 g Stbst. nach H_2SO_4 -Behandlung der Asche: 0.00172 g K_2SO_4 . — 2.593 mg Stbst.: 4.254 mg CO_2 , 1.376 mg H_2O . — $[\alpha]_D = +2.92^\circ \times 100/2.2 \times 0.5720$.

III. 2.643 mg Stbst.: 4.340 mg CO_2 , 1.622 mg H_2O . — $[\alpha]_D = +0.48^\circ \times 100/2.2 \times 0.2352$.

57. Arnold K. Balls und Franz Köhler: Über eine neue proteolytische Wirkung von Darmschleimhaut-Auszügen.

[Aus d. Institut für Biochemie d. Deutsch. Techn. Hochschule in Prag.]

(Eingegangen am 29. Dezember 1930.)

Vor kurzem haben A. K. Balls und F. Köhler¹⁾ über die Reaktionsweise der Dipeptidase und Amino-Polypeptidase aus Darm-Schleimhaut berichtet. Es konnte gezeigt werden, daß sowohl die Amino-Gruppe, wie auch die Imino-Gruppe des Peptids, mit den ereptischen Enzymen reagiert. Auszüge aus Darm-Schleimhaut zeigen indes hydrolytische Wirkung auch auf peptid-ähnliche Körper, die keine freie Amino- bzw. Carboxyl-Gruppe tragen; Chloracetyl-*o*-nitranilin z. B. wird von diesem Ferment-Präparat gespalten. Diese neu beobachtete Enzym-Wirkung stellt sich außer-

?) Asche-frei berechnet.

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

halb der bis jetzt bekannten Peptidase-Wirkungen; die ereptischen Enzyme reagieren mit der Amino- und Imino-Gruppe des Peptids, die Carboxy-Polypeptidase mit der Carboxyl- und Imino-Gruppe; die hier beschriebene Enzym-Wirkung kommt einem neuen Typus von Peptidasen zu, der offenbar nur mit der Imino-Gruppe reagiert.

Wir haben das Ferment bis jetzt in Darm-Schleimhaut und Leber vom Schwein, nicht aber in Pankreas-Auszügen gefunden. Es scheint entweder in sehr geringen Mengen vorzukommen oder durch Hemmungskörper leicht seine Aktivität einzubüßen; denn der an unseren Substraten meßbare Aciditäts-Zuwachs ist sehr gering. Mit Hilfe der Diazo-Reaktion²⁾ kann man die Spaltung von Anilin-Peptiden gut verfolgen. Bei Chloracetyl-*o*-nitranilin wird der Eintritt einer Spaltung schon durch die starke Gelbfärbung eines der Spaltprodukte, des *o*-Nitranilins, angezeigt; in diesem Falle tritt indes kaum eine acidimetrisch meßbare Hydrolyse ein. Denn die enzymatische Reaktion wird durch das bei der Reaktion entstehende Nitranilin stark gehemmt. Setzt man dem Verdauungs-Gemisch aber Formaldehyd, der das Nitranilin bindet, hinzu, so erreicht die enzymatische Hydrolyse eine wesentliche Steigerung.

Wir konnten mit unseren Enzym-Präparaten Chloracetyl-*d,l*-alanin, Chloracetyl-*d,l*-leucin und Benzoyl-triglycin, aber nicht Benzoyl-glycin oder -diglycin, spalten. Die Spaltung von Chloracetyl-*d*-alanin durch ereptisches Enzym, über die kürzlich E. Abderhalden³⁾ berichtete und die Spaltung von Benzoyl-tri- und -tetraglycin, deren Hydrolysierbarkeit Toru Imai⁴⁾ beobachtet hat, ist ohne Zweifel auf das oben beschriebene Ferment zurückzuführen.

Das Enzym wird aus Darm-Schleimhaut hergestellt. Nach einer Tonerde-Adsorption, bei einer Wasserstoff-Zahl von ca. 4.5–5, findet es sich in der Restlösung; aus dieser Lösung läßt es sich bei $p_{H} = 7.0$ an Tonerde C_{γ} adsorbieren, daraus mit sek. Phosphat eluieren. Von den ereptischen Enzymen kann es durch Behandlung mit Schwefelwasserstoff oder mit Blausäure befreit werden. Die Präparate enthalten weder tryptische noch katheptische Carboxy-Polypeptidase, noch Histozytm oder Prolyl-Peptidase. Das Enzym ist gegen Schwefelwasserstoff, Blausäure und Formaldehyd beständig; bei einer Temperatur von 70° wird es innerhalb von 2–3 Min. vollkommen zerstört.

Ob das neu beschriebene Enzym für die tierische Verdauung eine wesentliche Rolle spielt, ist infolge seiner geringen Konzentration bis jetzt nicht sicher zu beurteilen.

Das Enzym stellt, unserer Ansicht nach, einen neuen Typ von Peptidasen dar, der es gestattet, die Peptidasen nach dem nämlichen Prinzip einzuteilen, wie es heute bei den Proteinasen üblich ist: nämlich in Substratkationen, Substrat-Anionen und in iso-elektrische Substrat angreifende Enzyme⁵⁾.

²⁾ A. K. Balls u. F. Köhler, *B.* **64**, 34 [1931].

³⁾ E. Abderhalden u. E. v. Ehrenwall, *Ferment-Forsch.* **12**, 223 [1930].

⁴⁾ Toru Imai, *Ztschr. physiol. Chem.* **136**, 205 [1924].

⁵⁾ E. Waldschmidt-Leitz, A. Schöffner, J. J. Bek u. E. Blum, *Ztschr. physiol. Chem.* **188**, 17 [1930].

Beschreibung der Versuche.

1. Darstellung des Enzym-Präparates I.

Der Glycerin-Extrakt von Darm-Schleimhaut wurde mit einem gleichen Volumen Wasser verdünnt, mit $n/1$ -Essigsäure auf ein p_H von 4.5–5.0 gebracht, zentrifugiert, die Restlösung neutralisiert und durch Kieselgur abfiltriert. 80 ccm dieses „Roh-Erepsins“ wurden mit 6 ccm Tonerde (1 ccm = 31.3 mg Al_2O_3) adsorbiert und das Adsorbat, nach 1-maligem Waschen mit 20-proz. Glycerin-Wasser, mit 20 ccm $n/25$ -Ammoniak (25% Glycerin) eluiert. Diese Elution wurde unten als gereinigtes Erepsin bezeichnet. Die Rest-Lösung der Tonerde-Adsorption wurde noch 2-mal mit je 3 ccm Tonerde adsorbiert und 40 ccm davon wieder mit 5 ccm Tonerde bei $p_H = 7.0$ adsorbiert. Dieses Adsorbat wurde mit 10 ccm $n/10$ -sek.-Phosphat (20% Glycerin) eluiert.

In der folgenden Tabelle beziehen sich die Angaben auf ein Volumen von 5 ccm, das zur alkohol. Titration mit $n/20$ -Lauge verwendet wurde. In diesem Volumen befinden sich 0.0002 Mol. Substrat, 0.0004 Mol. Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer (1:1) und eine Enzym-Menge, die 0.5 ccm des ursprünglichen Roh-Erepsins entspricht. Wenn sonst nichts angegeben, so bedeuten die Angaben der Spaltung den Zuwachs nach 20 Stdn. und 30⁰. Um vergleichende Resultate zu erhalten, haben wir die in weniger Zeit gemessene Spaltung auf die Zeit von 20 Stdn. umgerechnet, unter der Annahme, daß die Verdauung direkt proportional der Zeit ist.

A = Versuch mit Roh-Erepsin.

B = Versuch mit gereinigtem Erepsin.

C = Versuch mit Erepsin-Restlösung (nach 3-maliger Tonerde-Adsorption).

D = Versuch mit der Phosphat-Elution, von dem bei $p_H = 7.0$ dargestellten Tonerde-Adsorbat der Erepsin-Restlösung.

E = Versuch mit der Erepsin-Restlösung C, nach 3 Stdn. Behandlung mit Schwefelwasserstoff.

F = Versuch mit aktivierter Carboxy-Polypeptidase; pro Bestimmung = 0.0019 Einheiten (als Trypsin).

Tabelle I.

Substrat	p_H	A	B	C	D	E	F
Leucyl-glycin	8.0	50 ¹⁾	44.6 ¹⁾	3.5 ²⁾	0.54	0.35	0.03
Leucyl-diglycin	8.0	21 ¹⁾	18.5 ¹⁾	2.0 ²⁾	0.68	0.70	0.15
Benzoyl-glycin	7.1			0.0			
Benzoyl-diglycin	8.0			0.0			
	4.5			0.0			
Benzoyl-triglycin.....	7.8		0.35	0.85	0.54		0.21
Chloracetyl-alanin	7.8		0.11	0.67	0.64	0.65	0.00
Chloracetyl-tyrosin	7.4		0.07	0.05		0.15	40.80 ¹⁾
Brom-isocapronyl-triglycin	7.8			0.10			0.00
Brom-isocapronyl-triglycyl-tyrosin	7.8			0.13			1.40
<i>d,l</i> -Prolyl-glycin	8.0			0.00 ²⁾			
Chloracetyl-leucin	7.8		0.40	0.86	0.32		0.96

1) Spaltung, bestimmt in 30 Min.

2) Spaltung, bestimmt in 5 Stdn.

2. Darstellung des Enzym-Präparates II.

Für dieses Präparat wurde eine andere Schleimhaut benützt. Eine Roh-Erepsin-Lösung, wie in I dargestellt, wurde 3 Stdn. mit Schwefelwasserstoff behandelt, das p_H auf 5.0 eingestellt und 25 ccm mit 1 ccm Tonerde C₇

adsorbiert. Die Restlösung wurde neutralisiert und durch Kieselgur abfiltriert. Die Bestimmungs-Bedingungen sind analog denen wie bei I.

Tabelle II.

Substrat	Spaltung durch	Spaltung durch mit
	Roh-Erepsin	H ₂ S behandeltes Präparat
Leucyl-glycin	13.30 ¹⁾	0.00
Leucyl-diglycin	20.00 ¹⁾	1.02
Chloracetyl-tyrosin	0.20	0.00
Chloracetyl-alanin	2.30 ²⁾	2.00 ¹⁾
Tetraglycin	—	0.30
Prolyl-glycin	—	0.00
Chloracetyl- <i>o</i> -nitranilin*)	—	0.70

¹⁾ Spaltung, gemessen in 30 Min. ²⁾ Spaltung, gemessen in 5 Stdn. *) In Suspension; pro Bestimmung enthaltend: 1 ccm $n/5$ -Phosphat und 0.3 ccm 7-proz. Formaldehyd.

3. Nachweis der Spaltung verschiedener Anilin-Peptide mittels der Diazo-Reaktion.

Die in der Tabelle angeführten Zahlen beziehen sich auf ein Volumen von 2 ccm, das zur Diazo-Reaktion verwendet wurde. Diese Proben enthalten die angegebene Menge Substrat, 0.2 ccm des Enzym-Präparates C und 0.2 ccm $n/5$ -Phosphat-Puffer; $p_H = 8.0$.

Tabelle III.

Substrat	Substrat	Zeit	Diazo-
	mg	Stdn.	Reaktion
Chloracetyl- <i>o</i> -nitranilin	5	24	++
Chloracetyl- <i>o</i> -nitro- <i>p</i> -toluidin	5	24	++
Chloracetyl- <i>m</i> -nitranilin	5	24	++
Chloracetyl- <i>p</i> -nitranilin	5	28	o
Acetanilid	5	6	±
Glycyl- <i>o</i> -amino-benzoesäure	5	18	±

(Die Zeichen bedeuten: o = keine Spaltung; ± = geringe Spaltung; ++ = deutliche Spaltung.)

4. p_H -Optimum der Enzym-Wirkung.

Die an der Spaltung von Chloracetyl-*p*-nitranilin, bei verschiedenen p_H , beobachteten Farben und die Titrations-Werte lassen erkennen, daß das p_H -Optimum bei ungefähr 8 liegt.

Tabelle IVa

p_H -Optimum, beobachtet an der Spaltung von Chloracetyl-*o*-nitranilin: 8.0 ccm des Verdauungs-Volumens enthielten 0.25 ccm Erepsin-Restlösung C, 1 ccm $n/5$ -Phosphat-Puffer und 20 mg Chloracetyl-*o*-nitranilin in Suspension. Nach den unten angegebenen Zeiten wurden 2 ccm dieser Lösung mit 0.5 ccm $n/1$ -NaOH versetzt, um die gelbe Farbe des entstehenden *o*-Nitranilins, die auch etwas vom p_H abhängig ist, vergleichen zu können.

p_H	15 Min.	45 Min.	120 Min.
4.5	o	o	±
6.0	o	±	+
7.0	±	+	+
7.5	±	+	++
8.0	+	++	++
8.3	±	±	+

(Die Zeichen bedeuten: o = keine Gelbfärbung; ± = geringe Gelbfärbung; + = starke Gelbfärbung; ++ = tief orange gefärbt.)

Tabelle IVb.

pH -Optimum, beobachtet an der Spaltung von Benzoyl-triglycin: Die Zahlen beziehen sich auf ein Titrations-Volumen von 5 ccm. Diese enthalten 0.0001 Mol. Benzoyl-triglycin, 1 ccm Enzym-Präparat wie bei C, 0.5 ccm $n/8$ -Phosphat-Puffer. Zeit: 110 Min., Temp.: 30°.

pH	6.0	7.0	7.4	8.0	8.3
Zuwachs ccm $n/20$ -NaOH	0.04	0.10	0.28	0.38	0.00

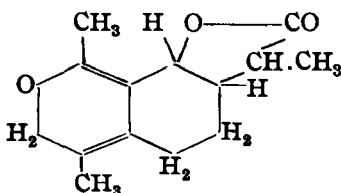
Der Deutschen Forschungs-Gemeinschaft danken wir ergebend für die zur Verfügung gestellten Mittel.

58. E. Wedekind und K. Tettweiler: Über die Lage der Doppelbindungen im Santonin; zugleich ein Beitrag zur Kenntnis der Halogen-Derivate des Santonins, sowie des sog. δ -Oxy-santonins (Studien in der Santonin-Reihe, 15. Mitteil.¹⁾).

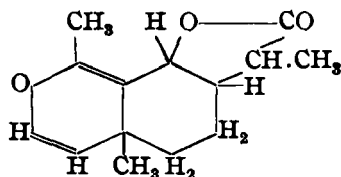
[Aus d. Chem. Institut d. Forstl. Hochschule Hann.-Münden.]

(Eingegangen am 20. Dezember 1930.)

Vor einiger Zeit stellten G. R. Clemo, R. D. Haworth und E. Walton²⁾ für das Santonin eine Formel auf, die sich von der bisher allgemein gebräuchlichen Formel von Cannizzaro³⁾ durch die Stellung der einen Methylgruppe und die Lage der beiden Doppelbindungen unterscheidet:



Santonin nach Cannizzaro.



Santonin nach
Clemo, Haworth, Walton.

Die Frage bezüglich des Bindungsortes der einen Methylgruppe konnte kürzlich durch die L. Ruzicka und E. Eichenberger⁴⁾ und unabhängig von ihnen G. R. Clemo und R. D. Haworth⁵⁾ gelungene Dehydrierung des Hexahydro-santonins bzw. des Desoxy-tetrahydro-santonins zum 1-Methyl-7-äthyl-naphthalin zugunsten der neuen Formel entschieden werden.

Unsicher blieb nunmehr nur noch die Lage der beiden im Santonin enthaltenen Doppelbindungen. Mit Recht weisen Clemo, Haworth und Walton darauf hin, daß in der Literatur kein einwandfreier Beweis für das Vorliegen der durch die Cannizzarosche Formulierung bedingten $-\text{CO}\cdot\text{CH}_2$ -Gruppe angegeben ist. Mithin erscheint ihre Annahme berechtigt, daß von dem der Ketogruppe benachbarten Kohlenstoffatom eine Doppelbindung ausgeht. Bei der Richtigkeit dieser Annahme würde erst durch Hydrierung des Santonins zum Tetrahydro-santonin diese Atomgruppierung auftreten. Einen Anhaltspunkt hierfür bietet die E. Wedekind⁶⁾ gelungene

¹⁾ 14. Mitteil.: B. 63, 50 [1930].

²⁾ Journ. chem. Soc. London 1929, 2368.

³⁾ Gazz. chim. Ital. 23, I 286 [1893].

⁴⁾ Helv. chim. Acta 13, 1117 [1930].

⁵⁾ Journ. chem. Soc. London 1930, 2579.

⁶⁾ B. 47, 2483 [1914].