

ist sehr unbeständig und geht an der Luft rasch in Ketopinsäure über; auch durch Ansäuern der Soda-Lösung (A) läßt sich Ketopinsäure (etwa 1 g) gewinnen.

10-Oxy-camphan ( $\omega$ -Borneol).

1.7 g 10-Oxy-campher-Semicarbazon werden mit Natriumäthylat-Lösung (aus 1.3 g Natrium + 9 ccm absol. Alkohol) in ein Rohr eingeschmolzen und 20 Stdn. auf 160–180° erhitzt. Dann wird der Röhreninhalt mit Wasserdampf destilliert und das krystallinische Destillat aus Petroläther umkrystallisiert, wobei farblose, nach Borneol riechende, lange Prismen vom Schmp. 200–201° erhalten werden. Ausbeute 1.1 g. Eine alkohol. Lösung (0.21 g in 10 ccm) dreht das polarisierte Licht nicht. Mit Phenylisocyanat in Petroläther entsteht kein Urethan.

4.685 mg Sbst.: 13.285 mg CO<sub>2</sub>, 4.92 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O. Ber. C 77.92, H 11.69. Gef. C 77.20, H 11.75.

10-Oxo-camphan ( $\omega$ -Campher).

1 g 10-Oxy-camphan wird mit 0.9 g Natriumbichromat in Eisessig-Lösung auf dem Wasserbade erwärmt; dann wird das Produkt mit Wasserdampf destilliert und das Destillat ausgeäthert. Der beim Verdampfen des Äthers verbleibende Rückstand wird zunächst nach der üblichen Methode in das Semicarbazon (farbloses, krystallinisches Pulver vom Schmp. 220–221°) übergeführt. Das daraus durch Säuren abgespaltete 10-Oxo-camphan bildet farblose Krystalle vom Schmp. 187–189° und riecht campher-artig.

5.17 mg Semicarbazon: 12.01 mg CO<sub>2</sub>, 4.32 mg H<sub>2</sub>O. — 4.04 mg Semicarbazon: 0.686 ccm N (18.5°, 756 mm).

C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>ON<sub>3</sub>. Ber. C 63.16, H 9.09, N 20.09.

Gef. „ 63.35, „ 9.32, „ 19.81.

### 232. Wolfgang Langenbeck und Josef Baltes: Über organische Katalysatoren, IX. Mitteil.<sup>1)</sup>: Die Struktur-Spezifität der Esterase-Modelle.

[Aus d. Chem. Institut d. Universität Münster i. W.]

(Eingegangen am 11. Juni 1934.)

Die Synthese von Ferment-Modellen wird in unserem Laboratorium durchgeführt, um auf diesem Wege die Konstitution der entsprechenden Fermente aufzuklären. Wir haben den Begriff „Ferment-Modell“ definiert durch den Satz: Ferment-Modelle sind organische Katalysatoren mit ferment-ähnlicher Wirkung<sup>2)</sup>. Dabei muß man an die Ähnlichkeit der Wirkung einen viel strengeren Maßstab anlegen, als es früher stets geschehen ist. Es genügt nicht, daß Substrat und Reaktionsprodukte dieselben sind, denn eine chemische Reaktion kann häufig durch die verschiedenartigsten Katalysatoren beschleunigt werden. Z. B. wird Wasserstoffperoxyd sowohl durch kolloidales Platin, wie durch Hämin zersetzt. Aus der äußerlichen Gleichartigkeit der

<sup>1)</sup> VIII. Mitteil.: B. 67, 387 [1934].

<sup>2)</sup> W. Langenbeck, *Ergebn. Enzym-Forsch.* 2, 315 [1933].

Reaktion läßt sich also noch kein Schluß auf eine ähnliche Konstitution der verwendeten Katalysatoren ziehen. Man muß deshalb fordern, daß ein Modell außerdem in wesentlichen Einzelheiten mit dem Ferment übereinstimmt, und zwar ist die Analogie nur dann gesichert, wenn kein anderer Katalysator-Typ diese Ähnlichkeit aufweist. Für einen solchen Vergleich sind vor allem die Erscheinungen der Kinetik und der Spezifität geeignet.

So haben wir bei den Carboxylase-Modellen zeigen können, daß Aldehyde in Abhängigkeit von der Substrat-Konzentration hemmen<sup>3)</sup>, genau wie bei der Carboxylase selbst, und die Esterasen werden durch Alkohole gehemmt, ähnlich wie die Esterase-Modelle, die wir in der VIII. Mitteilung beschrieben haben. Nach unserer Arbeits-Hypothese über den Bau der Enzyme<sup>4)</sup> kann ein Stoff hemmend wirken: 1) durch Verdrängungs-Reaktionen an der aktiven Gruppe, 2) durch Reaktion mit einer aktivierenden Gruppe und 3) durch Anlagerung an den kolloidalen Träger, wobei er z. B. dessen Dispersitätsgrad verändern kann. Für Typ 1 ist charakteristisch, daß der Hemmungs-Koeffizient<sup>5)</sup> mit wachsender Substrat-Konzentration sinkt. Beobachtet man diese Erscheinung, so darf man mit Bestimmtheit eine Reaktion der aktiven Gruppe annehmen, da dieser Vorgang auch modellmäßig verwirklicht worden ist.

Will man die Spezifität der Fermente zu ihrer Struktur-Aufklärung heranziehen, so kann man nicht erwarten, daß ein einfaches Modell schon in allen Punkten dieselbe spezifische Einstellung auf bestimmte Substrate zeigt, wie die Fermente. Wenn das trotzdem einmal der Fall ist, so wird man darin einen umso strengeren Beweis dafür sehen, daß die aktive Gruppe bei Ferment und Modell identisch ist.

Bei der Carboxylase war es die Unangreifbarkeit der Trimethylbrenztraubensäure<sup>6)</sup>, die sie mit ihren Modellen gemeinsam hatte. Die Esterase-Modelle sind für Spezifitäts-Versuche fast noch geeigneter, weil bereits eingehende Versuche über die Struktur-Spezifität der Esterasen vorliegen. J. H. Kastle<sup>7)</sup> hat gefunden, daß die sauren Ester der Oxal-, Bernstein-, Phthal- und Fumarsäure durch Esterase nicht gespalten werden. Spätere Untersuchungen<sup>8)</sup> haben diese Beobachtung dahin ergänzt, daß auch der Halbesther der Malonsäure nicht spaltbar ist, daß die Hydrolyse aber wieder bescheinigt wird, wenn die Carboxylgruppen weiter von einander entfernt sind, z. B. bei dem Adipinsäure-monoäthylester. Alle diese Ester tragen in ihrer Säure-Komponente eine zweite Carboxylgruppe. Kürzlich haben E. Bamann, E. Schweizer und M. Schmeller<sup>9)</sup> gezeigt, daß auch die Einführung einer Carboxylgruppe in die alkoholische Komponente des Esters dessen Spaltbarkeit meistens zum Verschwinden

<sup>3)</sup> W. Langenbeck, R. Jüttemann u. F. Hellrung, A. **499**, 201 [1932].  
W. Langenbeck, *Ergebn. Enzym-Forsch.* **2**, 328 [1933].

<sup>4)</sup> W. Langenbeck, *Ergebn. Enzym-Forsch.* **2**, 317 [1933]; *Ergebn. Physiol. u. exper. Pharmacol.* **35**, 488 [1933].

<sup>5)</sup> L. Michaelis u. P. Rona, *Biochem. Ztschr.* **60**, 62 [1914]; W. Langenbeck, R. Jüttemann u. F. Hellrung, a. a. O.

<sup>6)</sup> C. Neuberg und F. Weinmann, *Biochem. Ztschr.* **200**, 473 [1928].  
W. Langenbeck, *Angew. Chem.* **45**, 99 [1932].

<sup>7)</sup> *Amer. chem. Journ.* **27**, 481 [1902].

<sup>8)</sup> z. B. D. A. McGinty u. H. B. Lewis, *Journ. biol. Chem.* **67**, 567 [1926].

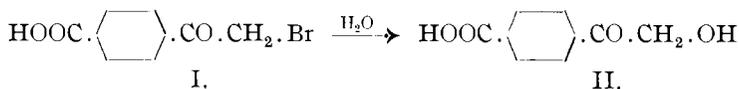
<sup>9)</sup> *Ztschr. physiol. Chem.* **222**, 121 [1933].

bringt. Zu dieser Klasse von sauren Estern gehört z. B. die Acetyl-mandelsäure.

Wir suchten für unsere Esterase-Modelle nach einem in Wasser leicht löslichen Substrat und hielten die Halbestere der Dicarbonsäuren für diesen Zweck geeignet. Um so überraschender war es für uns, daß der Bernsteinsäure-monoäthylester von Benzoyl-carbinol überhaupt nicht gespalten wurde. Die Hydrolysen-Geschwindigkeit war mit und ohne Katalysator praktisch die gleiche. Daraufhin untersuchten wir noch zwei weitere saure Ester, den Malonsäure-monoäthylester und die Acetyl-mandelsäure. Keiner wurde vom Katalysator angegriffen. Bestand nun wirklich eine Analogie zur Esterase, so mußte die Spaltbarkeit beim Adipinsäure-monoäthylester wieder erscheinen. Wir haben das Ergebnis dieses Versuchs deshalb mit besonderer Spannung erwartet. Tatsächlich wurde die Hydrolyse dieses Esters durch Benzoyl-carbinol beschleunigt.

Die beschriebenen Versuche sind so überraschend, weil gerade diejenigen Ester, die unter der katalytischen Wirkung der Hydroxyl-Ionen besonders schnell hydrolysiert werden, wie Bernsteinsäure- und Malonsäure-monoäthylester, gegen die katalytische Wirkung der aktiven Alkohole vom Typus der Benzoyl-carbinole völlig indifferent sind. Die Spezifität der organischen Katalysatoren ist also eine ganz andere als die der Hydroxyl-Ionen, und sie stimmt überein mit derjenigen der Esterase.

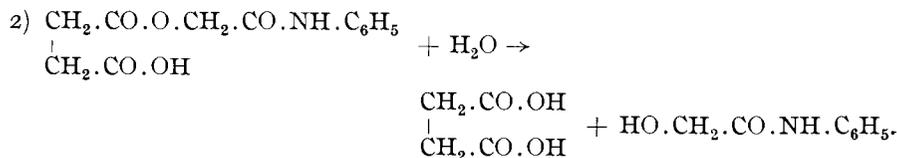
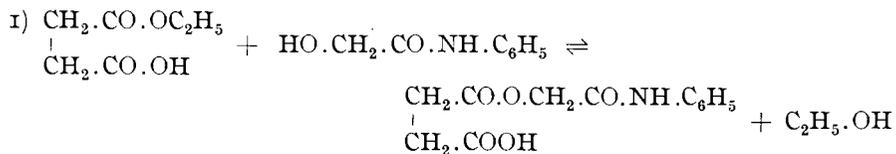
Bei der Suche nach aktiveren Esterase-Modellen haben wir auch die bisher unbekannte  $\omega$ -Oxy-acetophenon-4-carbonsäure (II) synthetisiert:



Sie war zwar gegen Methylbutyrat weniger aktiv als Benzoyl-carbinol, hatte aber die bemerkenswerte Eigenschaft, die Hydrolyse der Äthylschwefelsäure zu beschleunigen. Wir hatten diese Wirkung vermutet auf Grund der Beobachtung, daß  $\omega$ -Brom-acetophenon-4-carbonsäure (I) durch Wasser sehr leicht zu dem Carbinol II gespalten wird. Da man das Bromid I als den Ester der Bromwasserstoffsäure betrachten kann, lag es nahe, daß allgemein die anorganischen Ester von II eine hohe Reaktionsfähigkeit besitzen, die ja die Vorbedingung für eine katalytische Wirkung ist. Damit ist bewiesen, daß auch die Spaltung anorganischer Ester mit organischen Katalysatoren durchführbar ist. Übrigens besaß dieser gegen organische Ester trägere Katalysator auch eine geringere Spezifität. Er spaltete Bernsteinsäure-monoäthylester zwar schwach, aber immerhin deutlich.

Bamann und Mitarbeiter (a. a. O.) haben untersucht, ob die Beständigkeit der sauren Ester gegenüber Esterase auf mangelnder Affinität oder auf zu geringer Zerfalls-Geschwindigkeit der Enzym-Substrat-Verbindung beruht. Da die Hydrolyse von Methylbutyrat durch nicht-spaltbare saure Ester nicht gehemmt wird, nehmen sie fehlende Affinität an. Es ist nun ein weiterer Beweis für die neu entdeckte Analogie in der Spezifität, daß auch bei unseren Modellen keine Hemmung der Methylbutyrat-Spaltung durch Bernsteinsäure-monoäthylester zu beobachten ist. Die Hydrolyse ist fast genau durch die Summe der Spaltung von Bernsteinsäure-monoäthylester

und Methylbutyrat gegeben. Die katalytische Verseifung des Bernsteinsäuremonoäthylesters, z. B. mit Glykolsäure-anilid, müßte, wenn sie durchführbar wäre, nach folgendem Schema verlaufen:



Würde die Reaktion 1) eine merkliche Geschwindigkeit besitzen, Reaktion 2) dagegen nicht, so würde dabei ein Teil des Katalysators gebunden werden, was sich in einer verlangsamten Hydrolyse des Methylbutyrats äußern müßte. Da eine Hemmung nicht beobachtet wurde, darf man schließen, daß ebenso wie bei der Esterase das Substrat den Katalysator nicht bindet. Es ist noch nicht sicher, ob die Affinität oder die Reaktions-Geschwindigkeit von 1) zu gering ist. Welche von beiden Möglichkeiten zutrifft, muß durch Gleichgewichts-Messungen entschieden werden.

Durch die beschriebenen Analogien in der Spezifität ist bewiesen, daß die aktive Gruppe der Esterasen eine alkoholische Hydroxylgruppe ist, daß diese Fermente demnach Hauptvalenz-Katalysatoren sind. Damit wird auch rückwirkend unsere Ansicht weiter gestützt, daß die Carboxylase ein Hauptvalenz-Katalysator ist. Wir halten die Amino-gruppe der Carboxylase und die Hydroxylgruppe der Esterase nunmehr für gesichert.

Unsere Methode, die aktive Gruppe eines Enzyms aufzuklären, ist ebenso exakt, wie wenn es gelingen würde, ein Ferment frei von seinem Träger zu isolieren und die Gruppe analytisch nachzuweisen. Der synthetische Weg ist sogar exakter, da aus dem analytischen Nachweis nichts auf die Funktion geschlossen werden dürfte, die eine Gruppe im Enzym ausübt. Es könnte sich um die aktive, eine aktivierende oder auch um eine indifferente, für die Wirkung unwesentliche Gruppe handeln. Damit soll selbstverständlich nicht gesagt sein, daß Versuche zur Isolierung der Fermente nun entbehrlich geworden seien. Vielmehr führt die Enzym-Reinigung zu wichtigen Ergebnissen, welche geeignet sind, die synthetisch gewonnenen Resultate zu bestätigen und zu ergänzen.

### Beschreibung der Versuche.

#### Acetophenon-4-carbonsäure.

Das entsprechende Nitril wurde nach Ahrens<sup>10)</sup> aus 4-Amino-acetophenon dargestellt. Die von demselben Verfasser angegebene Verseifung des Nitrils mit alkohol. Kalilauge gab nur geringe Ausbeuten. Dagegen war

<sup>10)</sup> B. 20, 2956 [1887].

die Verseifung mit Schwefelsäure vorteilhaft. 8 g 4-Cyan-acetophenon wurden mit der 4-fachen Menge verd. Schwefelsäure (1:1) am Rückflußkühler zum gelinden Sieden erhitzt. Nach 15 Min. begannen sich Krystalle abzuscheiden, und nach  $\frac{1}{2}$ -stdg. Kochen war die Verseifung vollständig. Dann wurde mit Wasser verdünnt, abfiltriert und die Säure aus heißem Wasser umkrystallisiert. Schmp. 205<sup>0</sup>, Ausbeute 3.5 g.

$\omega$ -Brom-acetophenon-4-carbonsäure.

0.5 g Acetophenon-4-carbonsäure wurden in Eisessig mit einer Lösung von 0.5 g Brom in Eisessig tropfenweise versetzt. Beim Verdünnen mit Wasser schied sich das Bromderivat aus, das beim Umkrystallisieren aus Chloroform farblose, zu Büscheln vereinigte Nadeln vom Schmp. 220—221<sup>0</sup> gab.

3.18 mg Sbst.: 2.47 mg AgBr. — Ber. Br 32.9. Gef. Br 33.06.

$\omega$ -Oxy-acetophenon-4-carbonsäure.

3 g  $\omega$ -Brom-acetophenon-4-carbonsäure wurden mit 400 ccm Wasser 3 Stdn. am Rückflußkühler gekocht. Das Bromid hatte sich dann bis auf einen kleinen Rest gelöst. Nunmehr wurde mit Tierkohle kurz aufgekocht. Aus dem Filtrat schieden sich farblose Nadeln aus, die bei 248—250<sup>0</sup> unter Gelbfärbung und Zersetzung schmolzen und sich als vollständig rein erwiesen. Im Filtrat konnten mit Silbernitrat große Mengen Bromwasserstoff nachgewiesen werden. Die Oxy-acetophenon-carbonsäure reduzierte schon in der Kälte rasch Fehlingsche Lösung.

27.5, 30.0 mg Sbst.: 60.5, 66.3 mg CO<sub>2</sub>, 11.6, 12.4 mg H<sub>2</sub>O.

Ber. C 60.0, H 4.44. Gef. C 60.3, 60.0, H 4.7, 4.6.

Messung von Derivaten des Benzoyl-carbinols gegen Methylbutyrat<sup>11)</sup>.

Katalysator	Menge in Molen	Verbr. ccm $n_{10}$ -Ba(OH) <sub>2</sub> nach					
		5	10	15	20	25	30 Min.
Ohne Katalysator.....	—	0.08	0.17	0.30	0.41	0.50	0.60
Benzoyl-carbinol .....	$5 \cdot 10^{-4}$	1.00	1.38	1.60	2.70	3.35	3.80
[ <i>p</i> -Methoxy-benzoyl]-carbinol ..	$5 \cdot 10^{-4}$	0.35	0.85	1.36	1.82	2.40	3.00
[ <i>p</i> -Amino-benzoyl]-carbinol ...	$5 \cdot 10^{-4}$	0.40	0.80	1.15	1.55	1.98	2.40
$\omega$ -Oxy-acetophenon-4-carbon- säure .....	$5 \cdot 10^{-4}$	0.48	0.90	1.36	1.91	2.45	3.01

Verseifung von äthyl-schwefelsaurem Kalium.

Katalysator	Menge in Molen	Verbr. ccm $n_{10}$ -Ba(OH) <sub>2</sub> nach					
		10	20	30	40	50	60 Min.
Ohne Katalysator.....	—	—	—	—	—	—	0.0
Benzoyl-carbinol .....	$5 \cdot 10^{-4}$	—	—	0.03	—	—	—
$\omega$ -Oxy-acetophenon-4-carbon- säure .....	$5 \cdot 10^{-4}$	0.10	0.18	0.26	0.31	0.37	0.43

Die Substrat-Konzentration betrug 0.135 g äthyl-schwefelsaures Kalium, entspr. 0.1 g freier Säure, in 2 ccm Wasser.

<sup>11)</sup> Meßmethode wie in der VIII. Mitteilung, B. 67, 390 [1934]

## Verseifung von Bernsteinsäure-monoäthylester.

Katalysator	Mole		Verbr. ccm $n_{10}$ -Ba(OH) <sub>2</sub> nach					
	Substrat in 2 ccm	Kata- lyikator	5	10	15	20	25	30 Min.
Ohne Katalysator...	$6.6 \times 10^{-4}$	—	0.22	0.43	0.67	0.88	1.08	1.30
Benzoyl-carbinol ...	$6.6 \times 10^{-4}$	$5.10^{-4}$	0.23	0.45	0.67	0.90	1.10	1.32
Glykolsäure-anilid ..	$6.6 \times 10^{-4}$	$5.10^{-4}$	0.25	0.47	0.69	0.91	1.11	1.34
$\omega$ -Oxy-acetophenon- 4-carbonsäure ....	$6.6 \times 10^{-4}$	$5.10^{-4}$	0.30	0.56	0.82	1.08	1.33	1.60

Der Bernsteinsäure-monoäthylester wurde als Bariumsalz angewandt. Dieses war, ebenso wie alle anderen Halbestersalze, durch Waschen mit Äther sorgfältig vom Diäthylester befreit worden.

## Verseifung von Malonsäure-monoäthylester.

Katalysator	Mole		Verbr. ccm $n_{10}$ -Ba(OH) <sub>2</sub> nach					
	Substrat	Kata- lyikator	5	10	15	20	25	30 Min.
Ohne Katalysator...	$10^{-3}$	—	0.18	0.40	0.62	0.82	1.05	1.25
Benzoyl-carbinol ...	$10^{-3}$	$5.10^{-4}$	0.18	0.38	0.58	0.80	1.01	1.23

Der Ester wurde als Kaliumsalz eingewogen.

## Verseifung von Acetyl-mandelsäure.

Katalysator	Mole		Verbr. ccm $n_{10}$ -Ba(OH) <sub>2</sub> nach					
	Substrat	Kata- lyikator	5	10	15	20	25	30 Min.
Ohne Katalysator...	$10^{-3}$	—	0.23	0.44	0.66	0.88	1.11	1.34
Glykolsäure-anilid ..	$10^{-3}$	$5.10^{-4}$	0.22	0.43	0.65	0.88	1.10	1.33

1.06 g krystallwasser-haltige Acetyl-mandelsäure wurden mit Natronlauge genau neutralisiert und auf 10 ccm aufgefüllt. 2 ccm von dieser Lösung wurden für jede Messung verwandt.

## Verseifung von Adipinsäure-monoäthylester.

Katalysator	Mole		Verbr. ccm $n_{10}$ -Ba(OH) <sub>2</sub> nach					
	Sub- strat	Kata- lyikator	5	10	15	20	25	30 Min.
Ohne Katalysator.....	$10^{-3}$	—	0.06	0.10	0.15	0.19	0.23	0.27
Benzoyl-carbinol .....	$10^{-3}$	$5.10^{-4}$	0.11	0.20	0.29	0.38	0.46	0.53
$\omega$ -Oxy-acetophenon- 4-carbonsäure .....	$10^{-3}$	$5.10^{-4}$	0.21	0.39	0.57	0.74	0.91	1.08

Der Adipinsäure-monoäthylester wurde als Kaliumsalz eingewogen, das mit Äther besonders sorgfältig vom Diäthylester befreit worden war.

## Verseifung von Methylbutyrat bei Gegenwart von Bernsteinsäure-monoäthylester.

Katalysator	Mole		Verbr. ccm $n_{10}$ -Ba(OH) <sub>2</sub> nach					
		Kata- lyikator	5	10	15	20	25	30 Min.
Glykolsäure-anilid .....		$5.10^{-4}$	0.65	1.30	1.80	2.53	3.30	4.13 gef.
			0.55	1.23	1.87	2.58	3.28	4.00 ber.

Es wurden  $6.6 \times 10^{-4}$  Mole bernsteinsäure-äthylestersaures Barium und Methylbutyrat in gesättigter Lösung angewandt.

Die Zahlen der unteren Reihe sind berechnet aus der Summe der ccm Ba(OH)<sub>2</sub>, die bei der Verseifung von Methylbutyrat und von Bernsteinsäure-monoäthylester mit Glykolsäure-anilid erhalten worden waren.