

Die UV.- und IR.-Absorptionsspektren des reinen Corynantheins waren praktisch identisch mit den früher veröffentlichten. Eine Mischung von gleichen Teilen des reinen Dihydro-corynantheins vom Smp. 173—174° und des Corynantheins schmolz bei 168—169⁰¹).

Für die präparative Trennung wurden 20 g des rohen Corynantheins in 1 l Äther gelöst und im Scheidetrichter mit 1 l mit Äther gesättigten Puffer-Lösung geschüttelt. Diese Operation wurde insgesamt 21mal mit je 1 l frischer Puffer-Lösung ausgeführt. Die Puffer-Lösungen wurden darauf der Reihe nach mit 1 l frischem Äther ausgeschüttelt und diese zweite Operation mit je 1 l Äther 19mal wiederholt. Die vereinigten Äther-extrakte liessen beim Eindampfen 10,9 g Rückstand zurück, aus welchem durch Umlösen aus wässrigem Alkohol bei 60° 8,5 g reines Corynanthein vom Smp. 165—166° und einer Doppelbindungszahl $1,00 \pm 0,05$ erhalten wurden.

Zusammenfassung.

Durch Verteilung von rohem Corynanthein zwischen einer Citratpuffer-Lösung vom pH = 4,1 und Äther konnte das Corynanthein vom Dihydro-corynanthein getrennt und in reiner Form isoliert werden.

Laboratoire de pharmacie galénique, Faculté de pharmacie
de Paris, und Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Techn. Hochschule, Zürich.

44. Isolierung von Tetragalakturonsäure aus enzymatisch abgebauter Pektinsäure

von H. Altermatt und H. Deuel.

(23. XII. 52.)

Die in der älteren Literatur²⁾ beschriebenen ring- und kettenförmigen Tetragalakturonsäuren haben sich als höhermolekulare Polygalakturonsäuren erwiesen³⁾. Durch partiellen enzymatischen Abbau von Polygalakturonsäure (Pektinsäure) sollte es jedoch möglich sein, u. a. auch Tetragalakturonsäure zu erhalten. In derartigen Partialhydrolysaten konnte nun auch mit Hilfe der Papierchromatographie das Vorhandensein von Di- bis etwa Pentagalakturonsäure sehr wahrscheinlich gemacht werden⁴⁾. Die Isolierung

¹⁾ Die Smp. sind korrigiert und wurden mit einem geeichten Thermometer bestimmt. Sie liegen um etwa 3° tiefer als die von Karrer und Mitarbeiter (l. c.) angegebenen.

²⁾ F. Ehrlich & R. v. Sommerfeld, *Bioch. Z.* **168**, 263 (1926); F. Ehrlich, *Z. angew. Ch.* **40**, 1305 (1927); F. Ehrlich & F. Schubert, *B.* **62**, 1974 (1929); F. Ehrlich, in G. Klein, *Hdb. Pflanzenanalyse* **3**, 80 (1932); in E. Abderhalden, *Hdb. biol. Arbeitsmethoden* I, **11**, 1503 (1936).

³⁾ Vgl. Z. I. Kertesz, *The Pectic Substances*. Interscience Publ., New York 1951; B. Hottenroth, *Die Pektine und ihre Verwendung*. R. Oldenbourg, München 1951.

⁴⁾ M. A. Jermyn & R. G. Tomkins, *Biochem. J.* **47**, 347 (1950); W. W. Reid, *J. Sci. Food Agr.* **1950**, 234; H. Altermatt & H. Deuel, *Helv.* **35**, 1422 (1952); J. Solms, H. Deuel & L. Anyas-Weisz, *Helv.* **35**, 2363 (1952).

von Di- und Trigalakturonsäure aus diesen Hydrolysaten ist bereits kürzlich angegeben worden¹⁾.

In der vorliegenden Arbeit wird die Reindarstellung von Tetragalakturonsäure aus einer mit Schimmelpilz-Polygalakturonase partiell abgebauten Pektinsäure beschrieben.

Der enzymatische Abbau einer partiell neutralisierten, 1-proz. Pektinsäurelösung wurde papierchromatographisch verfolgt. Nach 11-stündiger Enzymeinwirkung konnte neben Mono-, Di- und Trigalakturonsäure und Spuren von Arabinose und Galaktose noch eine weitere Oligouronsäure, die sich als Tetragalakturonsäure erwies, erkannt werden. Zur Isolierung dieser Säure wurde die verschiedene Löslichkeit der Bleisalze der Oligogalakturonsäuren, die bereits zur Abtrennung der Di- und Trigalakturonsäure²⁾ verwendet worden war, ausgenutzt. Durch alkalische Bleiacetatlösung wird selbst die Monogalakturonsäure aus der wässrigen Lösung ausgefällt³⁾. Wird jedoch eine verdünnte wässrige Lösung von Oligogalakturonsäuren mit neutraler Bleiacetatlösung versetzt, so bleiben die Salze der Mono- bis Trigalakturonsäuren in Lösung, während das Bleitetragalakturonat ausfällt, das zu papierchromatographisch reiner Tetragalakturonsäure aufgearbeitet werden konnte.

Experimenteller Teil.

Enzymatischer Abbau. 50 g gereinigte Pektinsäure⁴⁾ wurden in Wasser dispergiert und durch partielle Neutralisation mit NaOH gelöst. Die auf 4,5 l aufgefüllte Lösung (pH = 4,0) wurde mit 0,5 l Polygalakturonaselösung, die 10 g Enzympräparat⁵⁾ enthielt, versetzt und 11 Std. bei 35° stehengelassen. Darauf wurde mit Aktivkohle und Kieselgur versetzt, aufgeköcht und heiss filtriert.

Isolierung und Reinigung der Tetragalakturonsäure. Das Filtrat wurde über 500 cm³ Kationenaustauscher Dowex 50 in der H-Form perkoliert, anschliessend im Vakuum bei 50° auf 500 cm³ eingengt und in 1,5 l Alkohol gegossen. Der flockige Niederschlag (vor allem Eiweisse des Enzympräparates und hochmolekulare Polygalakturonsäure) wurde abfiltriert und das klare, farblose Filtrat im Vakuum bei 45° zur Trockene eingedampft. Der Trockenrückstand, in 2 l Wasser aufgenommen, wurde mit einer wässrigen, neutralen Lösung von Bleiacetat (10% Überschuss in bezug auf Uronsäure) versetzt. Der gebildete voluminöse, flockige, weisse Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser ausgewaschen, in 1 l heissem Wasser aufgeschlämmt und unter kräftigem Rühren in 5 l Wasser von 85°, das 20 cm³ n. Essigsäure enthielt, gegossen. Nach 10 Min. wurde heiss filtriert. Der Niederschlag wurde noch 14mal diesem Reinigungs-

¹⁾ H. J. Phaff & B. S. Luh, Arch. Biochem. **36**, 231 (1952); H. Altermatt & H. Deuel, Helv. **35**, 1422 (1952); A. Ayres, J. Dingle, A. Phipps, W. W. Reid & G. L. Solomons, Nature **170**, 834 (1952).

²⁾ H. J. Phaff & B. S. Luh, Arch. Biochem. **36**, 231 (1952).

³⁾ F. Ehrlich, B. **65**, 352 (1932).

⁴⁾ H. Altermatt & H. Deuel, Helv. **35**, 1422 (1952).

⁵⁾ Die Polygalakturonase, ein Handelsprodukt der Firma Takamine Laboratory, Inc., Clifton, N. J., USA., wurde in freundlicher Weise von Herrn Dr. F. Weber, Küssnacht, zur Verfügung gestellt.

prozess unterworfen, bis papierchromatographisch neben der Tetragalakturonsäure nur noch in geringer Menge eine nichtwandernde, unbekannte Substanz nachweisbar war. Der gereinigte Niederschlag wurde mit 250 cm³ Dowex 50 in der H-Form in 250 cm³ Wasser einige Std. geschüttelt. Dann wurde abfiltriert und die Lösung über die gleiche Menge Kationenaustauscher perkoliert. Die Lösung wurde mit aschefreier Glycerinkohle und Kieselgur versetzt, erwärmt, abfiltriert und im Vakuum bei 40° auf 50 cm³ eingengt. Die bei der Papierchromatographie nichtwandernde Substanz und Aktivkohlereste wurden nach Ausflocken durch Zugabe von ca. 50 cm³ 96-proz. Alkohol abfiltriert. Anschliessend wurde im Vakuum auf einige cm³ eingedampft, dann mehrmals mit wenig abs. Alkohol versetzt und im Vakuum eingengt und schliesslich mehrmals mit wenig abs. Äther versetzt und eingengt, bis die Tetragalakturonsäure als weisses Pulver ausfiel. Dieses wurde abfiltriert und mit abs. Äther gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Ausbeute 3,8 g (7,6% der Ausgangspektinsäure).

Charakterisierung der Tetragalakturonsäure. Der Gehalt an Carboxylgruppen wurde durch Titration von ca. 0,4 g des Präparates in Wasser mit 0,1-n. NaOH bestimmt. Die Aldehydendgruppen wurden mit Hilfe der Hypojoditmethode¹⁾ an ca. 0,4 g bestimmt. Für die papierchromatographischen Analysen wurden die Proben 45 Std. bei 20° mit wassergesättigter Isobuttersäure²⁾ über *Whatman*-Papier Nr. 4 perkoliert und mit Phtalsäure-Anilin³⁾ entwickelt. Die R_A-Werte wurden durch Vergleich mit denjenigen der Monogalakturonsäure, die gleich 1 gesetzt wurden, erhalten.

C₂₄H₃₄O₂₅ (722,51) Ber. C 39,89 H 4,74% Gef. C 39,97 H 4,88%
Verhältnis —COOH/—CHO Ber. 4,00 Gef. 4,18 R_A-Wert 0,12

Die Mikroanalysen wurden von Herrn *A. Peisker*, Mikroanalytische Laboratorium, Brugg, ausgeführt.

Zusammenfassung.

Pektinsäure wurde durch eine Schimmelpilz-Polygalakturonase partiell abgebaut. Aus diesem Hydrolysat konnte Tetragalakturonsäure rein isoliert werden.

Agrikulturchemisches Institut
der Eidg. Techn. Hochschule, Zürich.

¹⁾ *R. Willstätter & G. Schudel*, B. **51**, 780 (1918); *E. F. Jansen & L. R. Macdonnell*, Arch. Biochem. **3**, 97 (1945).

²⁾ *M. A. Jermyn & R. G. Tomkins*, Biochem. J. **47**, 437 (1950).

³⁾ *S. H. Partridge*, Nature **164**, 443 (1949).