



JUSTUS LIEBIGS
ANNALEN
DER CHEMIE

HERAUSGEGEBEN VON
HEINRICH WIELAND
ADOLF WINDAUS · RICHARD KUHN

BAND 559 · HEFT 3

VERLAG CHEMIE GMBH · WEINHEIM/BERGSTR. · BERLIN

Liebigs Annalen der Chemie Weinheim/Bergstr. 1948 Band 559 Heft 3 · Seiten 153-233

Inhalt

Feodor Lynen und Hans Peter Hoffmann-Walbeck, Enzyme aus Schimmelpilzen. I. Über einige Gärungsfermente aus <i>Penicillium notatum</i> . (Mit 6 Figuren im Text)	153
Robert Purrmann und Fritz Eulitz, Zur Kenntnis des Erythropterins. Über die Flügelpigmente der Schmetterlinge XVI	169
Rolf Huisgen, Weitere Synthesen in der Reihe des 5,6(N)-Pyrrho-chinolins. Über Strychnos-Alkaloide XXXI. (Mit 5 Figuren im Text)	174
Heinrich Wieland, Rolf Huisgen und Robert Bubenik, Strychnin und Vomisin. Über Strychnos-Alkaloide XXXII. (Mit 2 Figuren im Text) .	191
Jakob Freimann und Wilhelm Franke, Zur Kenntnis der sog. Glucoseoxydase. IV. Beziehungen zwischen enzymatischer und antibakterieller Wirkung. (Mit 7 Figuren im Text)	199
Wilhelm Franke, Joseph Mönch, Dora Kibat und Annemarie Hamm, Zur Autoxydation der ungesättigten Fettsäuren. V. Die Wirkung der Soja-Lipoxydase. (Mit 5 Figuren im Text)	221
Berichtigungen	233

Mitarbeiter dieses Heftes: Prof. Dr. *Wilhelm Franke*, geb. 28. 5. 1903 München; *Jakob Freimann*, geb. 29. 9. 1885 Wormen (Letland); Dozent Dr. *Rolf Huisgen*, geb. 13. 6. 1920 Gerolstein; Prof. Dr. *Feodor Lynen*, geb. 6. 4. 1911 München; Dozent Dr. *Robert Purrmann*, geb. 30. 1. 1914 Paris; Geh. Rat Prof. Dr. *Heinrich Wieland*, geb. 4. 6. 1877, Pforzheim.

Für die Herren Mitarbeiter zur Beachtung

Eine wissenschaftliche Zeitschrift kann bei gleichen Herstellungskosten ihren Lesern um so mehr bringen, je knapper die einzelnen Beiträge in der Abfassung gehalten sind. Kürze der Darstellung ist dem Verständnis förderlicher als ungehemmte Weitschweifigkeit. Auf lange historische Einleitungen, wiederholte Beschreibung schon geschilderter Operationen, auf die liebevolle Charakterisierung an sich nebensächlicher Substanzen aus parallelen Reihen sollte verzichtet werden. Hier ist gedrängte Zusammenfassung im Lapidarstil am Platze.

Die Redaktion behält sich vor, Manuskripte, die den angeedeuteten Grundsätzen entgegenlaufen, dem Autor zur Kürzung zurückzusenden.

Abhandlungen, deren Inhalt, wenn auch nur teilweise, schon an anderer Stelle veröffentlicht worden ist oder veröffentlicht werden soll, werden nicht aufgenommen.

Es wird besonders gebeten, die Korrekturen rasch zu erledigen. Nur dann ist das schnelle Erscheinen der Abhandlungen gewährleistet. Verzögerte Korrekturen führen zur Zurückstellung des betr. Beitrags.

Zusammengesetzte Namen sollen der Übersichtlichkeit wegen schon im Manuskript unter Anwendung von Trennungsstrichen wiedergegeben werden, z. B. Methyl-naphthyl-ke-ton, nicht „Methylnaphthylketon“.

Formeln, die wiederkehren, werden zweckmäßig mit römischen Ziffern numeriert, die einen einfachen Hinweis gestatten.

Die Wiedergabe der Analysen ist von Band 430 an in der Schreibweise festgelegt. Wenn für dieselbe Substanz mehrere Analysen gleicher Art gebracht werden, empfiehlt sich die Anordnung gemäß folgendem Beispiel: 0,1270, 0,1404, 0,1176 g Subst.: 0,2854, 0,3062, 0,2459 g CO_2 , 0,0903, 0,1244, 0,0990 g H_2O .

Zitate von Zeitschriften werden nach dem jetzt allgemein eingeführten Brauch abgekürzt.

Die Redaktion

Liebigs Annalen erscheinen in Bänden zu je drei Heften. Die Redaktion besorgt Prof. Heinrich Wieland, (13b) Starnberg Obb., Schießstättstraße 12.

50 Sonderabzüge werden den Verfassern umsonst geliefert; eine größere Zahl kann zur Zeit wegen Papiermangels nur in Ausnahmefällen geliefert werden.

Abonnementspreis je Band 15,— RM. zuzügl. Versandkosten.

Copyright 1947 by Verlag Chemie, GmbH., (Lizenz US-W-1113 Eduard Kreuzhage) Weinheim/Bergstr. und Berlin — Printed in Germany — Alle Rechte, insbesondere das der Übersetzung, vorbehalten.



JUSTUS LIEBIGS ANNALEN DER CHEMIE

559. Band

Enzyme aus Schimmelpilzen

I. Über einige Gärungsfermente aus *Penicillium notatum*

Von *Feodor Lynen und Hans Peter Hoffmann-Walbeck**)

(Aus dem Chemischen Laboratorium der Universität München)

Mit 6 Figuren im Text

[Eingelaufen am 29. Doz. 1947]

Die meisten Autoren, die sich mit dem Stoffwechsel der Schimmelpilze beschäftigten, machen die Annahme, daß der Umbau der Zuckermolekel in *Essigsäure* in diesen Organismen über dieselben Zwischenprodukte verläuft wie in der Hefe. Dafür sprechen die Beobachtungen von C. Neuberg und C. Cohen¹⁾, daß auch bei Fadenpilzen *Acetaldehyd* mit Natriumsulfit abgefangen werden kann, sowie der Nachweis des carboxylatischen Zerfalls von *Brenztraubensäure* in *Aspergillus niger* und anderen Fadenpilzen durch T. Nagayama²⁾. Es war das Ziel unserer Versuche, die Lücke zwischen Traubenzucker und Brenztraubensäure auszufüllen. Dabei sollte vor allen Dingen die Beteiligung von *Phosphorsäureestern*, die ja von vornherein sehr viel Wahrscheinlichkeit für sich hatte, experimentell sichergestellt werden.

Als Enzymmaterial diente ein Stamm von *Penicillium notatum*³⁾, der in Oberflächenkultur auf Czapek-Dox-Lösung gezüchtet wurde. Zur Untersuchung kamen die durch das Ferment *Zymohexase* katalytisch beschleunigte reversible Spaltung des Fructose-diphosphats in Triosephosphat und die Dehydrierung des Triosephosphats zum Glycerinsäure-3-phosphat an der *Triosephosphat-Dehydrase*.

1. Zymohexase

Wenn Zymohexase den Harden-Young-Ester in zwei Moleküle Triosephosphat spaltet, entstehen aus einem gegen Alkali stabilen Phosphorsäureester solche, die durch n-NaOH zerlegt werden. Diese Veränderung,

*) Diplom-Arbeit, Universität München, 1946.

¹⁾ Bio. Z. 122, 204 (1921).

²⁾ Bio. Z. 116, 303 (1921).

³⁾ Der Penicillin produzierende *Penicillium notatum*-Stamm (SGP 23) wurde uns von Dr. Hans Knöll, Jena, überlassen, dem wir auch an dieser Stelle bestens danken.

die von O. Meyerhof und K. Lohmann⁴⁾ zum Nachweis der Zymohexase herangezogen wurde, diente D. Herbert, H. Gordon, V. Subrahmanyam und D. E. Green⁵⁾ bei der Isolierung des Ferments aus Kaninchenmuskeln zur quantitativen Bestimmung.

Mit Hilfe einer ähnlichen Testmethode, bei welcher das durch Natronlauge abspaltbare Phosphat proportional der Fermentmenge ist (Fig. 1), stellten wir fest, daß Zymohexase im Penicillium-Mycel in

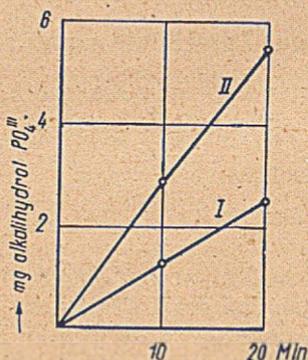


Fig. 1.
Zymohexase-Test

I: 0,5 g Mycel.
II: 1,0 g Mycel.

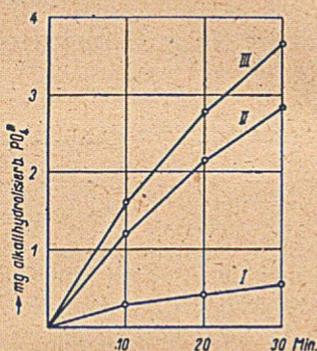


Fig. 2. Lokalisation
der Zymohexase

I: Rückstand.
II: Lösung.
III: Rückstand + Lösung.

hoher Aktivität enthalten ist. Berechnet man nämlich aus der Spaltungsgeschwindigkeit des Hexose-diphosphats die maximale Atmungsgröße — unter der Annahme, daß die Zuckermolekel vollständig verbrannt wird — dann ergibt sich $Q_{O_2}^6) = -82$, ein Wert, der den Sauerstoffverbrauch des Pilzes weit überschreitet.

Der *Fermentgehalt* des Mycel ändert sich während des Wachstums nur unwesentlich; ein zwei Tage alter Pilz besaß etwa dieselbe Aktivität wie einer, der sechs Tage gewachsen war und dabei reichlich Sporen gebildet hatte. Da aber die Ausbeute an Mycel nach sechs Tagen fast zehnmal größer war als nach zwei Tagen, ist es zweckmäßig, bei Untersuchungen über die Zymohexase aus *Penicillium notatum* mit älteren Kulturen zu arbeiten.

Das Ferment des Pilzes liegt als *typisches Lyo-Enzym* im Sinne der Anschauung R. Willstätters⁷⁾ vor, denn nach dem Zerreiben des

⁴⁾ Bio. Z. 271, 89 (1934).

⁵⁾ Bioch. J. 34, 1108 (1940).

⁶⁾ $Q_{O_2} = \text{mm}^3 \text{ O}_2 \text{ pro mg Trockengewicht pro Stunde.}$

⁷⁾ Vgl. E. Bamann und W. Salzer, Erg. Enzymf. 7, 28 (1938).

Mycel mit Sand läßt sich die Zymohexase nahezu vollständig mit Wasser extrahieren (Fig. 2). Auf Grund dieser Eigenschaft war damit zu rechnen, daß die Zymohexase beim Wachstum des *Penicillium notatum* auch zum Teil an die Nährflüssigkeit abgegeben wird, wie dies z. B. für die Glucose-Dehydrase bekannt ist⁸⁾. Doch hatte der Versuch in der intensiv gelb gefärbten Kulturflüssigkeit einer sechs Tage dauernden Züchtung eine Spaltung von Hexose-diphosphat nachzuweisen, ein vollkommen negatives Ergebnis.

Die rohe Zymohexase im Mycelextrakt erleidet fortschreitend Inaktivierung. Wird die Lösung bei Zimmertemperatur aufbewahrt, dann ist nach etwa vier Stunden keine Wirksamkeit mehr nachzuweisen (Fig. 3).

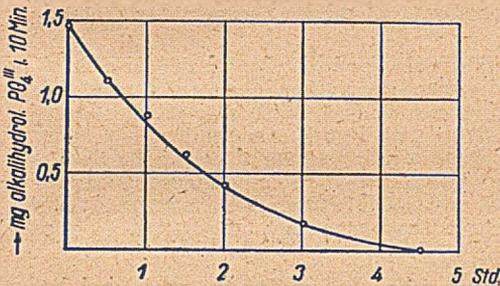


Fig. 3.

Inaktivierung der Zymohexase bei 18°.

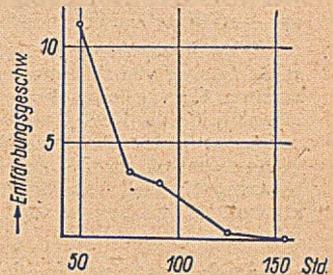


Fig. 4. Abhängigkeit der Triosephosphat-Dehydrase-Aktivität von der Züchtungsdauer.

2. Triosephosphat-Dehydrase

An die Spaltung des Fructose-diphosphats in Dioxyaceton-phosphat und Glycerinaldehyd-phosphat schließt sich in der Hefe die enzymatische Dehydrierung des Triose-phosphats, und zwar an der Molekel des Glycerinaldehyd-phosphats an. Auch diese Triosephosphat-Dehydrase ist in *Penicillium notatum* enthalten. Um sie nachzuweisen, wandten wir die Thunbergsche Acceptormethode, die Entfärbung von Methylblau, an. Wie H. von Euler, E. Adler und H. Hellström⁹⁾ für Hefe fanden, sind zur Übertragung des Wasserstoffs vom Glycerinaldehyd-phosphat auf den Farbstoff außer der spezifischen Apo-Dehydrase noch Co-Dehydrase I und Flavin-Enzym nötig. Im frischen Mycel sind alle drei Komponenten enthalten. An Stelle von Glycerinaldehyd-phosphat wandten wir Hexose-diphosphat als Substrat an, das ja nach den Ergebnissen des ersten Abschnitts in Gegenwart des

⁸⁾ W. Franke, A. 555, 111 (1944), dort auch weitere Literaturhinweise.

⁹⁾ H. 241, 239 (1936).

Schimmelpilzes mit den Triose-phosphaten im enzymatischen Gleichgewicht steht.

Im Gegensatz zu den Verhältnissen bei der Zymohexase ändert sich die Aktivität des dehydrierenden Systems während der Züchtung beträchtlich (Fig. 4). Die höchste Wirksamkeit besitzt ein 48 Stunden altes Mycel¹⁰); älteres Material ist sehr viel weniger aktiv. Im Zeitpunkt der Sporenbildung, die im Versuch zu Fig. 4 nach etwa 100 Stunden eintrat, sinkt die Entfärbungsgeschwindigkeit schlagartig. Bei Untersuchungen über die Triosephosphat-Dehydrierung ist es also ratsam, mit möglichst jungem Pilzmaterial zu arbeiten.

Mit der gleichen Methodik wurde in unserm *Penicillium*-Stamm auch das Vorkommen von *Citronensäure*-, *Milchsäure*- und *Bernsteinsäure-Dehydrase* nachgewiesen. Dagegen besitzt der Pilz keine *Alkohol-Apodehydrase* oder nur geringe Mengen dieses Proteins, denn mit Äthylalkohol tritt nur eine unwesentliche Erhöhung der Entfärbungsgeschwindigkeit ein.

Diese Beobachtung gewinnt im Zusammenhang mit der Frage nach der alkoholischen Gärung von Schimmelpilzen Bedeutung. Denn wären in unserm Pilz auch alle anderen Gärungsfermente vorhanden, so könnte doch keine alkoholische Gärung ablaufen, da die Reduktion des Acetaldehyds, die Hydrierungsreaktion der Gärung, nicht stattfindet. Unter aeroben Bedingungen jedoch ist der Übergang des Zuckers in Acetaldehyd möglich, da jetzt der Sauerstoff die Rolle des Wasserstoffakzeptors übernimmt. Vielleicht hängt es damit zusammen, daß viele Schimmelpilze keine alkoholische Gärung besitzen und nur die Erscheinung der „oxydativen Gärung“ zeigen.

Auch das System der Triosephosphat-Dehydrierung verliert beim Aufbewahren an Wirksamkeit (Fig. 5). Ob diese Inaktivierung die

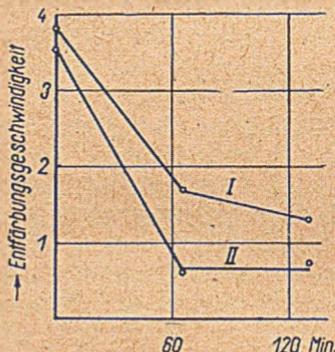


Fig. 5. Stabilität der Triosephosphat-Dehydrase
I: $\frac{m}{20}$ -Fluorid. II: ohne Zusatz.

Apo-Dehydrase, die Co-Dehydrase oder das Flavin-Ferment betrifft, wurde nicht untersucht. In Gegenwart von Fluorid ist die Wirksamkeitseinbuße geringer.

¹⁰) Jüngerer Mycel wurde nicht untersucht, da sich innerhalb 24 Stunden aus den eingesäten Sporen zu wenig Pilzfäden entwickelt hatten.

3. Isolierung der Phosphor-glycerinsäure

Um die bisher beschriebenen Versuche auf eine experimentell gesicherte Grundlage zu stellen, sollte das aus dem Fructose-diphosphat unter der Wirkung von Zymohexase und Triosephosphat-Dehydrase gebildete Reaktionsprodukt *Glycerinsäure-phosphat* exakt nachgewiesen und in Substanz isoliert werden. Zu diesem Zweck wurde das zerkleinerte Pilzmycel mit Fructose-diphosphat, Co-Dehydrase I, Arsenat und Fluorid unter Sauerstoff geschüttelt. Das *Arsenat* bewirkt, daß die Dehydrierung des Glycerinaldehyd-phosphats in irreversibler Reaktion direkt zum Glycerinsäure-3-phosphat führt, während ohne diesen Zusatz in umkehrbarer Reaktion Glycerinsäure-1,3-diphosphat gebildet würde¹¹⁾; das *Fluorid* unterbindet den Abbau des Glycerinsäure-phosphats¹²⁾, der *Sauerstoff* dient als Wasserstoffacceptor.

Zum Nachweis des dabei gebildeten Glycerinsäure-phosphats machten wir von der Tatsache Gebrauch, daß dreistündiges Kochen mit n-Salzsäure aus Fructose-diphosphat 93,6 % der gebundenen Phosphorsäure in Freiheit setzt, während Glycerinsäure-3-phosphat unter denselben Bedingungen nur zu 5,6 % hydrolysiert wird¹³⁾. Beim Übergang von Fructose-diphosphat in Glycerinsäure-phosphat nimmt daher das schwer hydrolysierbare Phosphat zu. Bestimmt man also das gegen Säure beständige Phosphat zu Beginn und am Ende des Versuches, dann gibt die Differenz das Phosphat der neugebildeten Phosphor-glycerinsäure wieder.

Mit Hilfe dieser Methode wurde gefunden, daß 2,86 g Mycel bei 25° innerhalb 3 Stunden 5,4 mg Phosphor-glycerinsäure (entsprechend 2,75 mg PO₄) bilden. Diese Säure ließ sich aus der Versuchslösung als kristallisiertes saures Bariumsalz zur Abscheidung bringen, wobei eine Vorschrift von K. Lohmann und O. Meyerhof¹⁴⁾ als Vorbild diente.

Um die Identität des isolierten Salzes mit phosphor-glycerinsäurem Barium, außer durch die Phosphatanalyse, auch noch auf einem anderen Weg zu erhärten, wurde es in enzymatischer Reaktion mit Hilfe eines Präparates aus Pferdeniere in Brenztraubensäure-phosphat umgewandelt. Dabei geht das gegen Säure beständige Phosphat der Phosphor-glycerinsäure zu einem großen Teil in das hydrolysierbare Phosphat der Phosphorbrenztraubensäure über.

Der Bayerischen Akademie der Wissenschaften danken wir für finanzielle Unterstützung der vorliegenden Arbeit.

¹¹⁾ O. Warburg und W. Christian, *Bio. Z.* **303**, 40 (1939).

¹²⁾ R. Nilsson, *Sv. kem. tidskr.* **41**, 169 (1929).

¹³⁾ R. Robison u. M. G. Macfarlane, in Bamann-Myrbäck, *Methoden der Enzymforschung*, Leipzig 1941, S. 312.

¹⁴⁾ *Bio. Z.* **273**, 60 (1934).

Versuchsteil

Züchtung des Pilzes. Der Pilz, *Penicillium notatum* SGP 23, wurde in Erlenmeyerkolben auf Czapek-Dox-Lösung (40 g techn. Glucose, 3 g NaNO₃, 1 g KH₂PO₄, 0,5 g KCl, 0,5 g MgSO₄ · 7 H₂O, 0,01 g FeSO₄ · 7 H₂O mit Leitungswasser auf 1 Liter) zur Entwicklung gebracht. Die Impfung geschah mit einer Sporensuspension in sterilem Leitungswasser, die aus Vorkulturen auf Bierwürze-Agar gewonnen wurde. Als optimale Züchtungstemperatur für unsern Stamm ergab sich T = 25°.

Versuche durch Zugabe von Hefekochsaft oder Citronensäure eine Verbesserung der Ausbeute hinsichtlich Mycelmenge oder Enzymaktivität zu erreichen, hatten keinen Erfolg; das Wachstum des Pilzes war gegenüber der zusatzfreien Kontrolle verzögert, vor allem in den Versuchen mit Citronensäure.

Innerhalb von 48 Stunden bildete sich ein dünnes Mycelhäutchen auf der Oberfläche der Nährlösung, welches hinsichtlich der Triosephosphat-Dehydrase die höchste Aktivität besaß. Nach etwa 96 Stunden hatte sich die Oberseite des Mycels durch die inzwischen eingetretene Sporenbildung grün verfärbt und gleichzeitig hatte die darunter befindliche Flüssigkeit eine gelbe Farbe angenommen, die auf ihren Gehalt an Chrysoenin zurückzuführen ist¹⁵). Nach 120 Stunden traten auf der Oberseite des Mycels intensiv gelbe Tränen auf.

Um das Pilzmaterial zu ernten, wurde die Nährlösung durch eine Glasritze abgesaugt, das Mycel mit etwa 1 Liter sterilem Leitungswasser gewaschen und nach dem Absaugen der Waschlösung auf Filterpapier leicht abgepreßt. Das auf diese Art gewonnene Mycel besitzt ein Trockengewicht von etwa 15 %.

1. Zymohexase

Bestimmungsmethode. Das frisch geerntete Mycel wurde unter Eiskühlung mit der gleichen Gewichtsmenge Sand und 5 Teilen Wasser, nach Zugabe eines Tropfens Toluol, in der Reibschale zerrieben. Der so bereitete Mycelbrei kam im Reagensglas nach Zugabe von 2 cem 0,43m-Kalium-hexosediphosphat-Lösung und evtl. Wasser zur Inkubation, die im Wasserbad bei 30° geschah. Sofort nach Zugabe des Substrats und nach verschieden langer Inkubationszeit wurden je 1 cem des Versuchsansatzes entnommen, mit 2 cem 20proz. Trichloressigsäure versetzt und auf 10 cem mit Wasser verdünnt. Die klare Lösung, nach Abfiltrieren der denaturierten Proteine, diente zur Phosphatbestimmung nach M. Martland und R. Robison¹⁶), wobei die kolorimetrische Messung der Farbintensität im Pulfrich-Stufenphotometer, unter Verwendung des Zeiß-Filters S 66,6/3,5, geschah. Als Vergleichslösung diente eine Probe mit bekannter Phosphatmenge.

Das anorganische Phosphat wurde direkt bestimmt, das alkali-hydrolysierbare Phosphat als Differenz zwischen diesem Wert und dem nach 20 Minuten langer Hydrolyse in n-NaOH bei T = 20° (Wasserbad) gemessenen Phosphatwert berechnet.

Die Werte aus Tab. 1 (vgl. auch Fig. 1) legen dar, daß die Menge des in einem gewissen Zeitintervall gebildeten, durch Alkali hydrolysierbaren Phosphats der Menge des zugesetzten Mycels direkt proportional ist. Die Bildungsgeschwindigkeit des durch Natronlauge abspaltbaren Phosphats ist also ein Maß für die vorhandene Zymohexase, falls nicht zu große Enzymmengen in Anwendung kommen.

Da 1 g Mycel (= 150 mg Trockensubstanz) in 10 Minuten 2,9 mg Triosephosphat-PO₄, d. h. 0,03053 m-Mol, bilden, 1 m-Mol Triose-phosphat bei der vollständigen Oxydation aber 67,2 cem Sauerstoff verbraucht, entspricht diese Spaltung einer

$$\text{Atmungsgröße von } Q_{O_2} = - \frac{67200 \times 6 \times 0,03053}{150} = - 82.$$

Daß zur Zeit 0 schon etwas hydrolysierbares Phosphat angetroffen wird, ist darauf zurückzuführen, daß Substrat und Enzymmaterial miteinander in Berührung kommen, bevor die erste Probe zur Bestimmung des Anfangswertes entnommen wird.

¹⁵) P. W. Clutterbuck, R. Lovell u. H. Raistrick, *Bioch. J.* **26**, 1907 (1932).

¹⁶) *Bioch. J.* **20**, 848 (1926).

Tab. 1

0,5 g (a) bzw. 1,0 g (b) Mycel, 4 Tage alt; 2 ccm 0,43m-Hexosediphosphat mit Wasser auf 10 ccm Gesamtvolumen. T = 30°.

Zeit (Min.)	Anorg. PO ₄ (in mg)	Anorg. + Alk.hydr.PO ₄	Alkalihydr. PO ₄	Differenz
a) 0	8,1	8,8	0,7	
10	8,8	10,8	2,0	1,3
20	9,2	12,4	3,2	1,2
b) 0	8,5	9,0	0,5	
10	10,0	13,4	3,4	2,9
20	11,3	17,3	6,0	2,6

Wenn dabei auch unter Eiskühlung gearbeitet wurde, um die Enzymwirkung möglichst hintanzuhalten, so ließ sich eine geringe Spaltung doch nicht vermeiden.

Im folgenden Versuch wurden die Änderungen im anorganischen und alkalilablen Phosphat über einen längeren Zeitraum verfolgt (Fig. 6). Im Ansatz mit Hexose-diphosphat (Kurve II) schließt sich an eine rasche Zunahme des labilen Phosphats in der ersten halben Stunde ein langsamerer Anstieg an, der bei etwa 210 Minuten, nach Erreichen des Gleichgewichts, zum Stillstand kommt. Von da ab nimmt das labile Phosphat wieder ab. Im Gegensatz dazu nimmt das anorganische Phosphat (I) über den ganzen Zeitraum hin zu, wobei allerdings auch hier die Geschwindigkeit ständig abnimmt. Ein Kontrollversuch ohne Zugabe von Hexose-diphosphat ergab, daß aus dem Pilzmycel allein keine durch Natronlauge hydrolysierbaren Phosphat-ester entstehen (II'); anorganisches Phosphat wird langsam in Freiheit gesetzt (I'). Die Bildung des anorganischen Phosphats in beiden Versuchsreihen

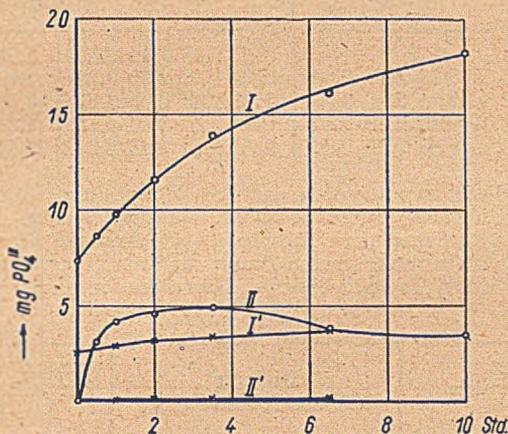


Fig. 6. Die Bildung von anorganischem und alkalilabilem Phosphat
 1 g Mycel (5 Tage alt, schon sporifiziert)
 I, II: 1 ccm 0,43m-Hexosediphosphat + 5 ccm Wasser
 I', II': 6 ccm Wasser
 T = 30°.

ist ohne Zweifel auf die Wirkung von *Phosphatasen* zurückzuführen, die aus den organischen Estern des Mycels oder des Substrats anorganisches Phosphat in Freiheit setzen.

Aus diesem Versuch ergibt sich für unsere Zwecke die praktische Schlußfolgerung, daß es, um ein exaktes Bild über die Zymohexaseaktivität zu erhalten, zwecklos ist, die Spaltungsversuche über eine halbe Stunde hinaus auszudehnen. Es wurde daher im folgenden stets die Bildung alkalilabiler Phosphate zwischen 0, 10, 20 und 30 Minuten gemessen.

Abhängigkeit der Zymohexase-Aktivität von der Züchtungsdauer

Das Ergebnis der Versuche mit Mycelien verschiedenen Alters ist in Tab. 1 zusammengestellt.

Tab. 1

Ansatz: 1,0 g Mycel + 5 ccm Wasser + 2 ccm 0,43m-Hexose-diphosphat.
T = 30°.

Bemerkungen zu den einzelnen Ansätzen:

2 Tage: dünnes weißes Mycelhäutchen (Ausbeute 0,4 g). Die Zahlen der Tabelle wurden durch Umrechnung auf 1 g Mycel erhalten.

3 Tage: Mycel rein weiß (Ausbeute 1,0 g).

4 Tage: schwach sporifiziert, gelbe Lösung (Ausbeute 2,2 g).

5 Tage: starke Sporenbildung, intensiv gelbe Tränen auf der Oberseite des Mycels (Ausbeute 3,8 g).

6 Tage: wie nach 5 Tagen, starke Träne (Ausbeute 3,8 g).

Alter des Mycels	Anorganisches PO ₄				Alkalilabiles PO ₄				Differenz		
	—	10	20	30	—	10	20	30	0—10	10—20	20—30
2 Tage. . .					0,40	2,05	3,10	3,86	1,65	1,05	0,76
3 Tage. . .	8,35	8,63	8,75	8,88	0,28	1,88	2,90	3,74	1,60	1,02	0,84
4 Tage. . .	8,85	9,24	9,56	9,80	0,39	1,96	2,99	3,85	1,57	1,03	0,86
5 Tage. . .	8,65	9,10	9,38	9,80	0,87	2,20	3,30	4,18	1,33	1,10	0,88
6 Tage. . .	9,10	9,37	9,55	9,66	0,00	1,43	2,48	3,28	1,43	1,05	0,80

Aus der Tabelle ist zu entnehmen, daß sich die Zymohexase-Aktivität über einen längeren Zeitraum hin nicht wesentlich ändert. Bei einem 27 Tage alten Mycel konnte allerdings weder Zymohexase noch Phosphatase nachgewiesen werden. Dieses Mycel hatte jedoch auch schon den gesamten Zucker der Nährlösung verbraucht und hatte auch die in den ersten Tagen gebildeten Säuren wieder verarbeitet (vgl. Tab. 2).

Tab. 2

Alter des Mycels	Drehung (20 cm Schichtdicke)	ccm n/10-NaOH verbr. zur Neutralisation von 10 ccm Nährlösung
75 Stunden	+ 9,40°	2,63
90 „	+ 8,80°	5,29
125 „	+ 6,85°	11,53
155 „	+ 5,30°	12,95
27 Tage	0,10°	0

Lokalisation der Zymohehexase

2 g Mycel (80 Stunden alt) wurden wie üblich in Suspension übergeführt. Die eine Hälfte dieses Enzympräparates wurde direkt zum Test verwendet. Der Rest (= 6 ccm) wurde unter Eiskühlung 10 Minuten lang bei 2500 Umdr./Min. (Ecco-Zentrifuge) zentrifugiert. Das Volumen der überstehenden gelblichen, etwas trüben Lösung wurde mit 1 ccm Wasser auf 6 ccm gebracht. Der aus den unlöslichen Mycelteilen und Sand bestehende Bodensatz wurde in 5 ccm Wasser aufgewirbelt und damit das Gesamtvolumen ebenfalls auf 6 ccm gebracht. Darauf wurden die drei Proben mit je 2 ccm 0,43m-Hexosediphosphat-Lösung versetzt und bei 30° inkubiert. Der Verlauf der Triosephosphat-Bildung ist in Fig. 2 graphisch wiedergegeben.

Es ist zu erwähnen, daß der Mycelextrakt viel Eiweiß enthält, das beim Kochen koaguliert.

Stabilität der Zymohehexase

4 g Mycel (4 Tage alt) wurden wie vorstehend beschrieben zu Lösung und Rückstand verarbeitet. Die das Ferment enthaltende Lösung (24 ccm) wurde bei 18° C im Wasserbad gehalten, im Abstand von etwa 30 Minuten wurden Proben zu je 3 ccm entnommen und nach Zugabe von je 1 ccm Hexosediphosphat-Lösung die Zymohehexase in der üblichen Anordnung bestimmt. Das innerhalb 10 Minuten im Testsystem gebildete alkalilabile Phosphat ist ein Maß für das noch wirksame Ferment. Ergebnis vgl. Fig. 3.

2. Triosephosphat-Dehydrase

Bestimmungsmethode. Die Methylenblau-Versuche wurden in Keilin-Röhrchen ausgeführt, wobei in den Hauptraum der Gefäße Enzym, Substrat und etwaige Zusätze einpipettiert wurden, in den Hohlstopfen 0,3 ccm m/1000-Methylenblaulösung. Durch Zugabe von Wasser wurde das Gesamtvolumen auf 2,0 ccm gebracht. Die evakuierten Röhrchen wurden im Thermostaten bei 30° gehalten und die Zeitspanne bis zur 90proz. Entfärbung des zugesetzten Farbstoffs gemessen.

Die Berechnung der *Entfärbungsgeschwindigkeit* erfolgte nach der Thunbergschen Formel:

$$E = 100 \left(\frac{1}{t_0} - \frac{1}{t} \right)$$

wobei: t_0 = Entfärbungszeit in Gegenwart von Substrat,

t = Entfärbungszeit des Kontrollansatzes *ohne* Substrat

bedeuten.

Für die Methylenblau-Versuche wurde das Mycel unter Eiskühlung mit 3 Teilen m/10-Phosphatpuffer, $p_H = 7,4$, in der Reibschale *ohne* Zusatz von Sand verrieben und von dieser Suspension jeweils 1 ccm in die Keilin-Röhrchen gegeben.

Abhängigkeit der Dehydrase-Aktivität von der Züchtungsdauer

Das Mycel zu diesen Versuchen war auf einer Kulturflüssigkeit mit der dreifachen Zuckerkonzentration gewachsen. Es hatte sich daher langsamer entwickelt und zeigte erst nach 100 Stunden starke Sporenbildung.

Im Versuch wurde 1 ccm Mycelsuspension mit 0,3 ccm 0,43m-Hexosediphosphat-Lösung, 0,4 ccm Wasser und 0,3 ccm m/1000-Methylenblau versetzt, die Entfärbungszeit gemessen und zur Berechnung der Entfärbungsgeschwindigkeit mit einem Kontrollversuch, der an Stelle des Zuckerphosphats 0,3 ccm Wasser enthielt, verglichen. Das Ergebnis ist in Fig. 4 graphisch dargestellt.

Nachweis von Citronensäure-, Milchsäure- und Bernsteinsäure-Dehydrase

Wie die Werte aus Tab. 3 zeigen, verkürzen außer Hexose-diphosphat auch Citrat, Laktat und Succinat die Entfärbungszeit. Die entsprechen-

den Dehydrasen sind also in unserm Pilz enthalten, wenn auch in geringerer Aktivität als die Dehydrase für Triose-phosphat.

Tab. 3

Je 1 ccm Mycelsuspension (60 Std. gezüchtet), 0,3 ccm m/1000-Methylenblau.

Zusätze (jeweils 0,3 ccm)	Entfärbungszeit (Min.)	Entfärbungs- geschwindigkeit
0,43m-K-hexosediphosphat	9	6,35
m/5-Na-citrat	12	3,57
m/5-Na-laktat	14	2,38
m/5-Na-succinat	13	2,93
ohne	21	—

Versuche über die Alkohol-Dehydrase

Auch die Alkohol-Dehydrase läßt sich mit der Methylenblautechnik untersuchen¹⁷⁾; auch hier sind für die Verschiebung des Wasserstoffs vom Substrat auf den Akzeptor außer der spezifischen Apo-Dehydrase noch Co-Dehydrase I und ein Flavin-Enzym notwendig. Da das Dehydrierungsprodukt des Alkohols, der Acetaldehyd, die Reaktion hemmt, muß durch Zugabe von *Semicarbazid* der Aldehyd aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden¹⁸⁾.

Wie die Versuche aus Tab. 4 beweisen — die mehrmals mit demselben Ergebnis wiederholt wurden — besitzt der von uns untersuchte *Penicillium*-Stamm *keine Alkohol-Dehydrase* oder nur geringe Mengen dieses Ferments. Mit Alkohol tritt nur eine unwesentliche Erhöhung der Entfärbungsgeschwindigkeit ein. Dieser Mangel betrifft die *Alkohol-Apodehydrase*; Co-Dehydrase I und Flavin-Enzym sind vorhanden, denn sonst dürfte im Kontrollversuch mit Hexose-diphosphat bzw. dem daraus entstehenden Triose-phosphat keine Dehydrierung ablaufen.

Tab. 4

Je 1 ccm Mycelsuspension (80 Stunden alt), 0,3 ccm m/1000-Methylenblau;
Gesamtvolumen: 2 ccm

Zusätze	Entfärbungszeit (Min.)	Entfärbungs- geschwindigkeit
ohne	65	—
0,3 ccm Alkohol	59	0,156
0,2 ccm m/10-Semicarbazid ¹⁹⁾	57	0,216
0,3 ccm Alkohol + 0,2 ccm m/10-Semicarbazid	59	0,156
0,3 ccm 0,43m-K-hexosediphosphat	32	1,58

¹⁷⁾ H. von Euler u. E. Adler, H. 226, 195 (1934), vgl. auch F. Lynen, A. 539, 8 (1939).

¹⁸⁾ E. Negelein u. H. J. Wulff, Bio. Z. 293, 351 (1937).

¹⁹⁾ 112 mg Semicarbazid-HCl in 10 ccm n/10-NaOH gelöst.

Das Fehlen der Alkohol-Apodehydrase ist kein allgemeines Charakteristikum der Schimmelpilze. In einem *Aspergillus niger*-Stamm konnte ein sehr wirksames Ferment nachgewiesen werden²⁰⁾.

Stabilität der Triosephosphat-Dehydrase

Es wurde die Aktivität einer bei 18° aufbewahrten Fermentlösung nach verschiedenen Zeiten im Methylenblau-Versuch gemessen.

Nachdem wir mit Hexose-diphosphat arbeiteten, war es notwendig, eine etwaige Inaktivierung der Zymohexase bedeutungslos zu machen. Aus diesem Grunde wurde der Fermentlösung von vornherein Hexose-diphosphat zugefügt, so daß das *frische* Ferment die Spaltung in die Triose-phosphate durchführen konnte, die dann in der Lösung fast vollständig erhalten bleiben (vgl. Fig. 6). Wird nunmehr in einer Probe die Dehydrase-Aktivität nach der Akzeptor-Methode gemessen, dann ist eine etwaige Wirksamkeitseinbuße auf Inaktivierung der Dehydrase zurückzuführen. Im einzelnen gingen wir folgendermaßen vor:

6 g Mycel (65 Std. alt) wurden mit 18 ccm Phosphatpuffer wie üblich verrieben und je 5 ccm dieser Suspension mit Zusätzen bei 18° inkubiert. Die Zusätze waren

I: 1,5 ccm 0,43m-Hexosediphosphatlösung

Ia: 1,5 ccm Wasser

II: 1,5 ccm 0,43m-Hexosediphosphatlösung + 0,5 ccm m-Natriumfluorid

IIa: 0,5 ccm m-Natriumfluorid + 1,5 ccm Wasser.

Zu den angegebenen Zeiten wurden je 1,3 ccm (I, Ia) bzw. 1,4 ccm (II, IIa) dieser Ansätze in Keilin-Röhrchen einpipetiert und nach Zugabe von 0,4 bzw. 0,3 ccm Wasser die Entfärbung von 0,3 ccm m/1000-Methylenblau in der üblichen Weise gemessen. Die Entfärbungszeiten und die daraus berechneten Entfärbungsgeschwindigkeiten sind in Tab. 5 aufgeführt (vgl. auch Fig. 5).

Tab. 5 (Entfärbungszeiten)

Inkubationsdauer (Min.)	I	Ia	II	IIa
0	13 3,54*	24	14 3,81*	30
65	37 0,62*	48	25 1,68*	43
130	49 0,74*	77	33 1,31*	58

* Entfärbungsgeschwindigkeit.

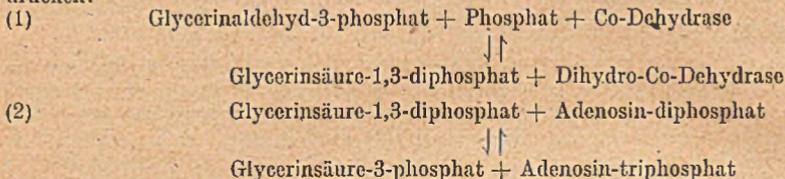
Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, geht die Wirksamkeit des Ferments unter den angewandten Bedingungen innerhalb einer Stunde stark zurück. Ob diese Inaktivierung die Apo-Dehydrase, die Co-Dehydrase oder das Flavinzym betrifft, wurde nicht untersucht.

In diesem Zusammenhang ist es jedoch bemerkenswert, daß durch m/20-Fluorid (II, IIa) die Aktivität des dehydrierenden Systems konserviert werden kann. Dies macht es recht wahrscheinlich, daß die Inaktivierung hier in erster Linie die Co-Dehydrase betrifft, zumal in Versuchen, über die hier im einzelnen nicht berichtet werden soll, der Nachweis geführt wurde, daß Extrakte aus Schimmelpilzen zugesetzte Co-Dehydrase I rasch unwirksam machen. Damit stimmt auch die Beobachtung überein, daß nach Zusatz von Co-Dehydrase Fluorid keinen Einfluß mehr auf die Entfärbungsgeschwindigkeit hat (vgl. Tab. 6).

²⁰⁾ F. u. F. Lynen, unveröffentlichte Versuche.

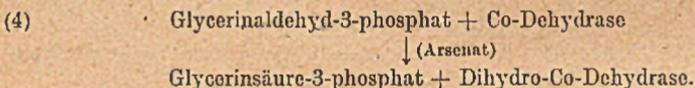
3. Isolierung der Phosphor-glycerinsäure

Vorversuche. Wie die Versuche von O. Warburg und Mitarbeitern²¹⁾ ergeben haben, handelt es sich bei der Dehydrierung des Triose-phosphats zur Phosphor-glycerinsäure um eine komplexe Reaktionsfolge, die — was hier wesentlich ist — zu einem Gleichgewicht führt. Wir können sie durch folgende Gleichungen ausdrücken:



Um also maximalen Umsatz zu erzielen, ist es nicht nur notwendig, das System durch Zugabe von Co-Dehydrase zu sättigen, sondern man muß auch dafür Sorge tragen, daß durch Entfernung des Adenosin-triphosphats die Reaktion vollständig nach rechts abläuft. Dies kann durch Zugabe von Glucose erreicht werden, wobei dann unter Mitwirkung eines spezifischen Ferments Glucose-6-phosphat entsteht (Gleichung 3).

(3) Adenosin-triphosphat + Glucose \rightarrow Adenosin-diphosphat + Glucose-6-phosphat
 Oder aber man macht sich die Beobachtung von D. Needham und R. Pillai²²⁾ zunutze, daß in Gegenwart von Arsenat die Dehydrierungsreaktion von vornherein irreversibel abläuft (Gleichung 4).



Tab. 6

Je 1 ccm Mycelsuspension (65 Stunden alt), 0,3 ccm m/1000-Methylenblau;
 Gesamtvolumen 2 ccm.

a) m/16-Hexose-diphosphat, b) Kontrolle.

Zusätze	Entfärbungszeit		Entfärbungs- geschwindigkeit.
	a	b	
2 mg Co-Dehydrase I ²³⁾ (= Co I)	10 5	44 34	7,7 17,1
2 mg Co I	14	23	2,80
2 mg Co I + m/20-Fluorid	14	21	2,39
2 mg Co I + m/100-Arsenat ²⁴⁾	13	25	3,69
2 mg Co I + m/20-Glucose	10	16,5	3,94
2 mg Co I + m/20-Fluorid + m/100-Arsenat	12	30	5,00

²¹⁾ O. Warburg u. W. Christian, *Bio. Z.* **303**, 46 (1939); E. Nagelein u. H. Brömel, *Bio. Z.* **303**, 132 (1939); Th. Bücher, *Biochimica et Biophysica Acta* **1**, 292 (1947).

²²⁾ *Bioch. J.* **31**, 1837 (1937).

²³⁾ Das zu diesen und den folgenden Versuchen angewandte Präparat von Co-Dehydrase I war aus Hefekochsaft durch Extraktion mit Phenol (O. Warburg u. W. Christian, *Bio. Z.* **298**, 150 [1938]) und Fällung mit Quecksilberacetat dargestellt worden. Es war etwa 10proz.

²⁴⁾ Als Na_2HAsO_4 -Lösung zugesetzt.

Diese Beziehungen, die am Ferment der Hefe und des tierischen Muskels entdeckt wurden, treten, wie aus Tab. 6 zu entnehmen ist, auch bei der Dehydrase der Schimmelpilze in Erscheinung. Sowohl durch Co-Dehydrase als auch durch Zugabe von Traubenzucker oder Arsenat wird die Entfärbungsgeschwindigkeit beträchtlich erhöht. Fluorid hat die Aufgabe, den Abbau auf der Stufe der Phosphor-glycerinsäure festzuhalten.

Aus etwa 15 derartigen Acceptorversuchen ließen sich die Entfärbungsgeschwindigkeiten der Tab. 7 berechnen. Dabei ist für die Geschwindigkeit in Gegenwart von Hexose-diphosphat und Co-Dehydrase willkürlich der Wert 100 angenommen worden.

Tab. 7

Zusätze	Entfärbungsgeschwindigkeit
m/16-Hexose-diphosphat	35—65
„ + 2 mg Co I	100
„ + „ + m/20-Fluorid	80—90
„ + „ + „ + m/100-Arsenat	130—200
m/16-Hexose-diphosphat + 2 mg Co I + m/100-Arsenat	120—130
„ + „ + m/20-Glucose	130—150

Somit ergibt sich für unsere Zwecke die praktische Schlußfolgerung; daß bei Versuchen zur Isolierung der Phosphor-glycerinsäure Co-Dehydrase, Arsenat und Fluorid zuzusetzen sind.

Nachweis der Phosphor-glycerinsäure

Versuch I: 20 g Mycel (mit Sand zerrieben) wurden mit 60 ccm m/20-Phosphat, p_H 7,4, 5 ccm Co-Dehydraselösung (= 100 mg des Co I-Präparates), 5 ccm m-Na-Fluorid, 5 ccm m/5-Na-arsenat und 2 ccm 0,43m-K-hexosediphosphat versetzt. Diesem Ansatz wurde nach gründlichem Mischen eine Probe entnommen, mit Trichloressigsäure die Enzymtätigkeit abgestoppt und die verschiedenen Phosphatfraktionen bestimmt²⁵⁾. Der Rest wurde unter Sauerstoff 300 Minuten lang bei 30° geschüttelt. Als Wasserstoffakzeptor für die Dehydrierungsreaktion kam also Sauerstoff in Anwendung, dessen Eignung in einem Vorversuch ermittelt worden war. Am Ende des Versuchs wurde wiederum eine Phosphatanalyse durchgeführt. Es wurden gefunden:

	Anorg. PO ₄ (in mg)	Gesamt-PO ₄	Schwerhydrolys. PO ₄ (Gesamt-PO ₄ — 180°-PO ₄)
bei Versuchsbeginn	212	405	14
nach 300 Minuten	221	405	24

Es waren also im Versuch 10 mg schwerhydrolysierbares Phosphat gebildet worden.

Versuch II: In diesem Versuch sollte die Empfindlichkeit der kolorimetrischen Phosphatbestimmung, die im vorhergehenden Versuch durch die großen Mengen

²⁵⁾ Methodik vgl. R. Robison u. M. G. Macfarlane in Bamann-Myrbäck, Die Methoden der Fermentforschung, Leipzig 1941, S. 310.

anorganischen Phosphats nicht allzu hoch war, vergrößert werden. Um dies zu erreichen, wurde nach dreistündiger Hydrolyse mit $n\text{-HCl}$ bei 100° das anorganische Phosphat mit Magnesiamixtur ausgefällt und im Filtrat das schwerhydrolysierbare Phosphat nach Veraschung kolorimetrisch bestimmt.

Zwei Parallelansätze (A und B) bestanden aus je 2,86 g Mycel (100 Stunden alt), dem nach Zerreiben mit 9 ccm $m/20$ -Phosphat, p_{H} 7,4, 2 ccm $0,43m\text{-K-hexosediphosphat}$, 0,8 ccm $m\text{-Na-fluorid}$, 0,8 ccm $m/5\text{-Na-arsenat}$ und 0,8 ccm $\text{Co-Dehydraselösung}$ (= 16 mg Substanz) zugesetzt wurden. Die beiden Ansätze wurden in Rollflaschen mit Glasstopfen bei 25° 3 Stunden lang unter Sauerstoff geschüttelt. Es wurden gefunden:

	schwerhydrolysierbares PO_4 (in mg)	
	A	B
bei Versuchsbeginn	20,3	19,7
nach 3 Stunden	23,0	22,5
Zunahme	2,7	2,8

Isolierung der Phosphor-glycerinsäure

20 g Mycel (100 Stunden alt) wurden unter Zusatz von 20 g Sand mit 60 ccm $m/20$ -Phosphatpuffer, p_{H} 7,4, zerrieben und 5 ccm $m\text{-Na-fluorid}$, 5 ccm $m/5\text{-Na-arsenat}$, 2 ccm $0,43m\text{-K-hexosediphosphat}$ sowie 5 ccm $\text{Co-Dehydraselösung}$ (= 100 mg Substanz) zugesetzt. Das Ganze wurde in einer Flasche 300 Minuten lang bei 25° unter Sauerstoff geschüttelt, dann mit 20 ccm 20proz. Trichloressigsäure versetzt und der ausgefallene Niederschlag abzentrifugiert. Das Filtrat der Eiweißfällung wurde schwach ammoniakalisch gemacht, das anorganische Phosphat mit Magnesiamixtur gefällt und in der Zentrifuge abgetrennt. Die klare Lösung wurde mit Essigsäure auf p_{H} 8 gebracht, eine Lösung von 0,76 g Bariumacetat in wenig Wasser zugefügt und das Ganze mit demselben Volumen Äthylalkohol versetzt. Nach etwa 12stündigem Verweilen im Kühlschrank wurde die Fällung abzentrifugiert, in 10 ccm Wasser aufgeschlämmt und mit 15 ccm Alkohol wieder ausgefällt. Der in der Zentrifuge abgetrennte Niederschlag kam nach Waschen mit Alkohol und Äther im Exsikkator zur Trocknung. Das trockene Pulver (= 715 mg) wurde mit 1,5 ccm $n\text{-Salpetersäure}$ verrieben, das Ungelöste abzentrifugiert und der Bodensatz nochmals mit 1 ccm und dann mit 0,5 ccm Salpetersäure in der gleichen Weise behandelt. Die vereinigten Filtrate von gelbbrauner Farbe wurden tropfenweise mit $2n\text{-NaOH}$ versetzt, bis Kongopapier gerade nicht mehr gebläut wurde. Der dabei auftretende geringfügige Niederschlag wurde abzentrifugiert und das klare Filtrat nach Animpfen mit phosphor-glycerinsaurem Barium im Kühlschrank aufbewahrt. Dabei schieden sich neben kleinen hellgrauen Kriställchen des gesuchten Bariumsalzes auch wohlausgebildete Kristalle von Bariumnitrat ab. Der Bodensatz wurde nach etwa acht Tagen abzentrifugiert und mit 1 ccm Wasser durchgerieben, wobei Bariumnitrat in Lösung ging. Der unlösliche Rückstand wurde an der Zentrifuge zweimal mit je 0,25 ccm Wasser gewaschen und dann im Exsikkator getrocknet. Ausbeute: 2,1 mg.

Aus der Mutterlauge der ersten Kristallisation konnte nach weiterem 14tägigen Verweilen im Kühlschrank auf die gleiche Weise noch 1,0 mg des rohen Bariumsalzes gewonnen werden, so daß sich die Ausbeute aus diesem Ansatz auf insgesamt 3,1 mg erhöhte.

Wir stellten einen Ansatz wie in den vorhergehenden Versuchen zusammen, mit dem Unterschied, daß an Stelle des Pilzmycels 10 mg phosphor-glycerinsaures Barium zugesetzt wurden. Bei der Aufarbeitung dieser Mischung über die verschiedenen Stufen unsres Isolierungsverfahrens kamen schließlich 1,9 mg des rohen kristallinen Bariumsalzes zur Abscheidung, also eine Menge, die ungefähr der im Normalansatz isolierten Substanz entspricht.

Wir dürfen daher die Annahme machen, daß in unsren Versuchen mehr Phosphor-glycerinsäure entstanden war, als wir isolieren konnten. Dafür sprechen auch die Ergebnisse der Phosphatanalyse (vgl. S. 166), die wesentlich größere Mengen Phosphor-glycerinsäure anzeigten.

Um die Möglichkeit auszuschalten, daß die Phosphor-glycerinsäure schon von Anfang an vorhanden war und nicht erst während des Versuchs entstanden ist, wurde ein neuer Versuchsansatz in zwei Teile geteilt, die eine Hälfte sofort mit Trichloressigsäure abgestoppt, die andre 3 Stunden lang unter Sauerstoff geschüttelt und dann erst mit Trichloressigsäure versetzt. Beide Teile wurden in der beschriebenen Weise aufgearbeitet. Während aus der inkubierten Hälfte wieder 2,1 mg Bariumsalz isoliert wurde, konnte in der sofort abgestoppten Probe keine Phosphor-glycerinsäure gefunden werden.

Identifizierung des phosphor-glycerinsauren Bariums

Zu diesen Versuchen standen 13,0 mg rohes Bariumsalz zur Verfügung, das aus mehreren Ansätzen gewonnen worden war. Das Rohprodukt wurde nach A. Vercellone und C. Neuberg²⁶⁾ mit 1 ccm 0,05n-HCl verrieben, das Unlösliche abzentrifugiert und die klare Lösung mit 2 ccm Äthanol versetzt, worauf das Salz in nadel- bzw. scherenförmigen Kristallen wieder zur Ausscheidung kam. Ausbeute: 6,9 mg.

Die Phosphatanalyse ergab die Werte von Tab. 8, in welcher auch die Werte eines Vergleichspräparates von reiner Phosphor-glycerinsäure aufgenommen sind. Es wurden jeweils 3 mg Substanz eingesetzt.

Tab. 8

	Gesamt-PO ₄		Schwerhydrol. PO ₄	
	in mg	in %	in mg	in % (des Ges.-PO ₄)
Isoliertes Bariumsalz	0,703	23,4	0,605	86,1
Phosphor-glycerinsaures Barium . . .	0,722	24,1	0,626	86,8

Es erschien uns wünschenswert, die Identität unsres Salzes mit phosphor-glycerinsaurem Barium noch auf einem anderen Wege zu beweisen. 3-Phosphor-glycerinsäure steht, wie O. Meyerhof und Mitarbeiter²⁷⁾ entdeckten, mit 2-Phosphor-glycerinsäure und Phosphorbrenztraubensäure im enzymatischen Gleichgewicht, dessen Lage von der Temperatur abhängig ist. Bei 60° enthält das Gemisch 41 % Phosphorbrenztraubensäure. Diese Säure wird aber beim Kochen mit n-Salzsäure während 60 Minuten quantitativ gespalten²⁷⁾, während aus den Phosphor-glycerinsäuren unter denselben Bedingungen nur 2 % des Phosphats in Freiheit gesetzt werden. Wir können also durch eine Phosphatanalyse die Umwandlung des Glycerinsäure-phosphats in Brenztraubensäure-phosphat verfolgen.

²⁶⁾ Bio. Z. 280, 161 (1935).

²⁷⁾ K. Lohmann u. O. Meyerhof, Bio. Z. 273, 60 (1934); O. Meyerhof u. W. Kießling, Bio. Z. 276, 239 (1935).

Als Enzymquelle diente ein Extrakt aus Pferdeniere, zu dessen Bereitung 100 g in der eisgekühlten Fleischhackmaschine zerkleinertes Gewebe mit 100 cem destill. Wasser bei 0° verrieben und die Zelltrümmer abzentrifugiert wurden. Nach Zugabe von 0,26% NaHCO_3 wurde die überstehende trübe Lösung bei Zimmertemperatur 2 Stunden lang gegen eine 0,26proz. NaHCO_3 -Lösung dialysiert. Dieser Vorgang hat den Zweck, den Phosphatgehalt der Enzymlösung zu verringern und durch Entfernung der im frischen Extrakt vorhandenen Adenin-phosphorsäuren die Hydrolyse der Phosphor-brenztraubensäure zu verhindern²⁸⁾.

Eine Mischung aus 1 cem Enzymlösung und 1 cem einer Lösung von phosphor-glycerinsaurem Natrium (aus 3,8 mg Ba-salz dargestellt) wurde 1 Minute lang bei 60° gehalten, dann mit 2 cem 20proz. Trichloressigsäure versetzt und mit Wasser auf 10 cem verdünnt. Aliquote Teile der filtrierten Lösung dienen zur Analyse. Es kamen nebeneinander reines Ba-glycerinsäurephosphat und unser Bariumsalz zur Anwendung, wobei die Bestimmungen ergaben:

	Nierenextrakt allein	Nierenextrakt + reines Salz (0,917 mg PO_4)	Nierenextrakt + isoliertes Salz (0,890 mg PO_4)
Anorg. PO_4 (in mg)	0,485	0,603	0,652
Differenz		0,118	0,167
Anorg. PO_4 + 60'- PO_4 ²⁹⁾	0,485	0,919	0,946
60'- PO_4	0	0,316	0,294

Die Zunahme des anorganischen Phosphats im Ansatz mit Phosphor-glycerinsäure läßt erkennen, daß die Inaktivierung der Enzymlösung nicht vollständig erreicht wurde und ein Teil der Phosphor-brenztraubensäure der Spaltung anheimfiel. Dieser Anteil ist dann natürlich von der Gesamtmenge des zugesetzten Esterphosphats in Abzug zu bringen, so daß sich folgende Bilanz ergibt.

	Theorie	reines Salz (in mg PO_4)	isoliertes Salz
als Phosphor-glycerinsäure zugesetzt		0,917	0,890
anorg. PO_4 gebildet		0,118	0,167
Rest		0,799	0,723
davon in 60 Min. durch n-HCl hydro- lysiert		0,316	0,294
das sind	41 %	39,6 %	40,7 %

²⁸⁾ Vgl. K. Lohmann in Bamann-Myrbäck, Die Methoden der Fermentforschung, Leipzig 1941, S. 2564.

²⁹⁾ 60'- PO_4 = während 60 Minuten bei 100° durch n-HCl abgespaltenes PO_4 .

Zur Kenntnis des Erythropterins Über die Flügelpigmente der Schmetterlinge XVI¹⁾

Von Robert Purrmann und Fritz Eulitz

(Aus dem Chem. Laboratorium der Bayer. Akademie der Wissenschaften zu München)

[Eingelaufen am 1. Januar 1948]

Pieriden haben in den Flügelschuppen Pigmente aus farblosen, gelben und orangeroten Substanzen. Die verbreitetste farblose Substanz ist Leukopterin (I). Als gelber Farbstoff ist bisher nur Xanthopterin (II) gut definiert. Der *orangerote* Farbstoff war von C. Schöpf näher untersucht und als *Erythropterin* bezeichnet worden²⁾ (eventuell als Gruppenbezeichnung, falls es sich um mehrere Individuen handeln sollte).

Die Untersuchungen werden kompliziert durch ein tief violettrottes Oxydationsprodukt, *Pterorhodin*, das sich in sauren Lösungen der meisten Pieridenpigmente bildet. Es leitet sich auch vom Pteridin-Gerüst ab, und die Konstitution dürfte der Formel III entsprechen¹⁾. Die natürliche *Vorstufe* dieses Pterorhodins ist aber noch nicht bekannt. Schöpf²⁾ und Hopkins³⁾ halten Erythropterin für die Vorstufe. In der Tat findet man, arbeitet man die erythropterinhaltigen Rohpigmente z. B. von *Catopsilia argante* auf Pterorhodin auf¹⁾, in den Mutterlaugen kein Erythropterin. Und isoliert man nach der Vorschrift, die wir anschließend geben, aus dem Pigment von *C. argante* reines Erythropterin, so ist daneben nur wenig Pterorhodin zu gewinnen. Während hier also Erythropterin an der Bildung des Pterorhodins beteiligt zu sein scheint, verweist Hopkins aber ausdrücklich³⁾, wie schon einmal zitiert, auf einige ganz blaßgelbe Pieriden, die wenig Erythropterin enthalten und die besonders hohe Ausbeuten an Pterorhodin geben. Und ein Begleiter des Xanthopterins (der durch Umkristallisation des Bariumsalzes nicht abzutrennen war) ist auch eine Pterorhodin-Vorstufe, aber sicher nicht Erythropterin, er ist farblos oder blaßgelb.

Schöpf hat Erythropterin durch Fraktionieren mit Salzsäure angereichert und schließlich aus heißer, verdünnter Salzsäure kristalline Produkte erhalten. Je weiter aber die Reinigung getrieben wird, desto niedriger wird der Stickstoffgehalt und desto geringer am Ende die Menge des daraus zu gewinnenden Pterorhodins. Wir sind bereit, dieses von Schöpf fast rein isolierte Produkt als Erythropterin zu bezeichnen, aber dann ist Erythropterin nicht *die*, sondern allenfalls ein Teil einer Vorstufe, denn wenn es schließlich ganz rein ist, entsteht daraus durch Oxydation keine Spur Pterorhodin mehr. Es mag füglich bezweifelt werden, daß dieses Erythropterin genuin sei. Denn sowohl bei der Auf-

¹⁾ XV. Mitteilung R. Purrmann u. M. Maas, A. 556, 186 (1944).

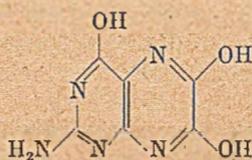
²⁾ C. Schöpf u. E. Becker, A. 524, 49 (1936).

³⁾ Proc. Roy. Soc. (B) 130, 359 (1942).

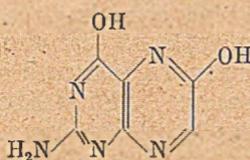
arbeitung von Schöpf, als auch bei der Aufarbeitung, die wir anschließend beschreiben; kann ein empfindliches Molekül verändert werden. Aber das Chromophor und die Löslichkeitseigenschaften bleiben unbeeinflusst.

Während Xanthopterin mit schwefliger Säure reagiert⁴⁾, ist das Chromophor des Erythropterins gegen SO_2 stabil. Wird die Lösung des Pigmentes von *C. argente* in Ammoniak mit einem Überschuß von SO_2 gefällt, dann bleiben Xanthopterin als SO_2 -Addukt und die basischen Pigmentbestandteile in Lösung, während Erythropterin und Leukopterin ausfallen, die nach einigen Wiederholungen dieser Operation durch Verwendung von wenig Ammoniak, in dem Erythropterin viel leichter löslich ist als Leukopterin, oder von Pottaschelösung, in der das Kaliumsalz des Leukopterins sehr schwer löslich ist, leicht getrennt werden können. Das so gewonnene rohe Erythropterin gibt mit Schwefelsäure 1:1 ein schön kristallisiertes hellrotes Sulfat und daraus mit 35- bis 40proz. Überchlorsäure ein ebenso schönes Perchlorat. Man erhält die freie Verbindung aus diesen Salzen mit heißer n/100 Salzsäure in prachtvollen chromsäurefarbenen Blättchen.

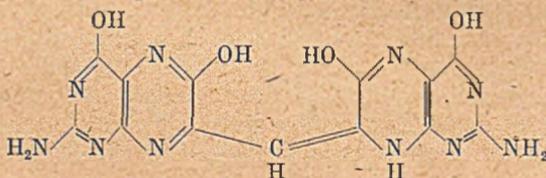
Formel IV sei für Erythropterin vorgeschlagen. Die Analysen des Sulfats und Perchlorats passen auf die Summe $\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_5\text{N}_5$. Die Oxydation mit Perhydrol in Schwefelsäure gibt Xanthopterincarbonsäure (V) (neben Leukopterin), womit Art und Substitution des Heterocyclus und die Stellung der Seitenkette bestimmt sind. Katalytische Hydrierung entfärbt die Lösung vollständig — wohl unter Bildung von VI —, während die Reoxydation der farblosen Lösung (VI) mit Pt/O_2 zu der charakteristischen Farbe und Fluoreszenz des Xanthopterin-Systems (VII) und nicht mehr zurück zur Farbe des Erythropterins führt.



I.
Leukopterin

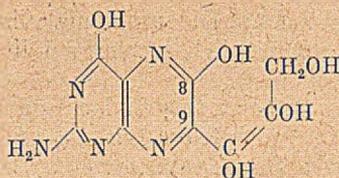


II.
Xanthopterin



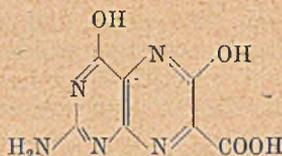
III. Pterorhodin

⁴⁾ H. Wieland u. R. Purrmann, A. 539, 179 (1939).



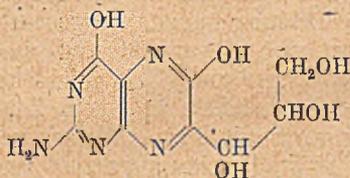
IV.

Erythropterin

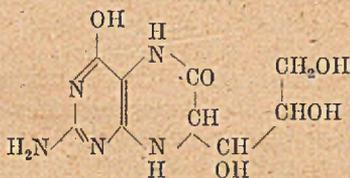


V.

Xanthopterin-carbonsäure



VII.



VI.

Die Erythropterin-Formel hat kein asymmetrisches C-Atom. Die tautomeren Formeln sind gleichwertig, doch muß in Konjugation zum Heterocyclus (Xanthopterinchromophor) eine CO- bzw. CC-Doppelbindung sein, um die Farbe des Erythropterins zu erklären.

Erythropterin gibt mit o-Phenylendiamin in verdünnter Salzsäure eine tief violettrote Substanz, die das gleiche Chromophor wie Pterorhodin besitzt und ihm auch sonst zum Verwechseln ähnlich ist. In dieser Verbindung ist ein Pteridin- mit einem Chinoxalin-Kern verknüpft, während Pterorhodin zwei Pteridin-Kerne enthält. Aber mit 2.4.5-Triamino-6-oxypyrimidin gab Erythropterin unter den versuchten Bedingungen kein Pterorhodin. Während also eine Pterorhodin-Vorstufe sehr wohl eine leicht spaltbare Verbindung des Erythropterins mit der Triamino-Base sein könnte, bleibt die endgültige Aufklärung dieser Verhältnisse einer weiteren Untersuchung vorbehalten.

Die bisher in der Natur gefundenen Derivate des Pteridins sind im Pyrimidin-Ring gleich substituiert und Erythropterin fügt sich in diesen Rahmen. In der Folinsäure ist die Seitenkette in Stellung 8⁵⁾, im Erythropterin (und Pterorhodin) ist sie in 9.

Versuche

Erythropterin aus *C. argente*

50 g mit Äther entfettete Flügel (von etwa 2500 Tieren) werden viermal mit insgesamt 2 l siedendem Spirit (3% Eisessig) übergossen und abgepreßt und mit 350 ccm Wasser gewaschen. Dann 1mal mit 400 und 3mal mit 300 ccm 0,2 n NH₃ durchgeknetet und abgepreßt und die Flüssigkeit durch Papierschleim gesaugt. (Weitere Extraktion mit

⁵⁾ R. B. Angier usw., Science 103, 667 (1946).

n/2 NH₃ gibt wenig und unreines Produkt.) Die ammoniakalischen Lösungen werden gemeinsam mit 500 ccm 1 n SO₂-Lösung gefällt und abgeschleudert. Lösung I.

Der Niederschlag wird mit Wasser zu 350 ccm aufgerieben und unter Abkühlung mit 250 ccm 2n-NH₃ versetzt (noch trübe Lösung) und mit 600 ccm 1n-SO₂-Lösung gefällt. Dann wird SO₂-Gas bis zur kongosauren Reaktion eingeleitet und wieder abzentrifugiert. Lösung II.

Der Niederschlag wird nun mit Wasser aufgerieben und mit 100 ccm 2n-NH₃ ausgezogen und abgeschleudert: der Rückstand enthält das Leukopterin. In die Lösung wird unter Kühlung bis zur kongosauren Reaktion SO₂ eingeleitet. Zentrifugieren gibt Lösung III und einen Niederschlag, der im Zentrifugenglas mit Wasser und Sprit gewaschen und im Exsikkator getrocknet und dann vorsichtig in 5 ccm konz. Schwefelsäure gelöst wird. Die Lösung wird mit 5 ccm Wasser versetzt und nach einigem Stehen wird die Kristallisation abgesaugt und, mit H₂SO₄ 1:1, Eisessig und Äther gewaschen. Ausbeute 175 mg Erythropterinsulfat in hochroten Blättchen. Zur Reinigung werden 100 mg Sulfat in 0,5 ccm konz. Schwefelsäure mit 0,5 ccm Wasser versetzt und wie oben abgesaugt und gewaschen.

Zur Analyse wurde bei 110° i. V. getrocknet.

C ₉ H ₉ O ₅ N ₅ · H ₂ SO ₄ (365,3)	Ber.: C 29,59	H 3,04	N 19,17
	Gef.: „ 30,19	„ 3,49	„ 19,47.

Zur Darstellung des *Perchlorats* werden 20 mg Sulfat in 0,7 ccm 40proz. Überchlorsäure warm gelöst. Beim Stehen kristallisieren 15 mg stabförmige dunkelorange Prismen, die mit Überchlorsäure, Alkohol und Äther gewaschen und bei 120° i. V. getrocknet werden.

C ₉ H ₉ O ₅ N ₅ · HClO ₄ (367,7)	Ber.: C 29,40	H 2,74	N 19,05	Cl 9,64
	Gef.: „ 30,03	„ 2,82	„ 18,62	„ 9,62.

Zur Darstellung von kristallisiertem Erythropterin werden 20 mg gepulvertes Sulfat (oder Perchlorat) mit 5 ccm n/100 HCl übergossen, aufgekoht und warm abgesaugt. Es kristallisieren 13 mg prachtvolle, dunkelrote Blättchen.

Die von Schöpf aus verschiedenen Pieriden durch Fraktionieren mit Säure und Umlösen aus n/10 bzw. n/100 HCl gereinigten Präparate von freiem Erythropterin gaben Analysenwerte, die im Kohlenstoff- und Wasserstoffgehalt gut stimmen, im Stickstoffgehalt zu hoch liegen.

C ₉ H ₉ O ₅ N ₅ (267,2)	Ber.: C 40,45	H 3,40	N 26,21
von Schöpf	Gef.: „ 40,20	„ 3,24	„ 31,66 ⁵⁾ .

Die Lösungen I, II und III wurden i. V. eingedampft und mit Wasser abgesaugt und gewaschen. Die so erhaltenen 3,8 g Substanz gaben mit Barytwasser nach der üblichen Vorschrift 2 g Xanthopterinbarium, aus dem durch Oxydation mit Luft-sauerstoff in n/4 HCl nur 32 mg Pterorhodin gewonnen werden konnten, gegen 450 mg aus der gleichen Flügelmenge nach der früher gegebenen Vorschrift.

⁵⁾ Bei C und H Mittel aus 17 Werten, die zwischen 38,81 und 41,48% für C und 2,97 und 3,58% für H streuen. Bei N Mittel aus 26 Werten, die zwischen 27,29 und 35,02% streuen.

Der oben erwähnte Rückstand, der das Leukopterin enthält, wird in 50 ccm Wasser mit 5 ccm 2n NaOH heiß gelöst, von einigen Flocken filtriert und in 100 ccm siedende 2n-Salzsäure getropft. Der Niederschlag wird mit 1,5 ccm Jodwasserstoffsäure (D 1,96) ausgekocht und zweimal aus Natronlauge/Salzsäure umgefällt. Ausbeute 286 mg krist. Leukopterin.

Xanthopterincarbonsäure aus Erythropterin

61 mg Erythropterinsulfat in 0,4 ccm konz. Schwefelsäure werden kalt mit 0,1 ccm Perhydrol in 1,9 ccm konz. Schwefelsäure vermischelt und 40 Min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die dann hellgelb gewordene Lösung wird (zu insgesamt 30 ccm) auf Eis gegossen und eine Nacht im Eisschrank stehen gelassen. Abzentrifugiert, mit Sprit und Äther gewaschen und getrocknet erhält man 29 mg hellgelbe Substanz, die mit insgesamt 1,8 ccm 2n Pottaschelösung in kleinen Anteilen im Zentrifugenglas warm ausgezogen wird. Rückstand I. Die gelbe Lösung wird mit Wasser auf 10 ccm aufgefüllt und siedend in 5 ccm siedende 2n Salzsäure getropft. Der abzentrifugierte Niederschlag (16 mg) wird mit 0,5 und 0,4 ccm 2n-Pottaschelösung warm und zweimal mit 0,1 ccm kalt ausgezogen. Sehr geringer Rückstand II.

Die gelben, stark grün fluoreszierenden Lösungen werden mit Wasser auf 15 ccm verdünnt und siedend in 9 ccm 2n-Salzsäure getropft. Der gelbe Niederschlag wird auf der Zentrifuge mit Wasser bis zur beginnenden kolloidalen Auflösung gewaschen.

Ausbeute 14 mg Xanthopterincarbonsäure = 38 % d. Th., identisch mit der synthetischen Verbindung⁶).

Zur Analyse wurde bei 120° i. V. getrocknet.

$C_7H_6O_4N_5$ (223,2)	Ber.: C 37,67	H 2,26	N 31,38
	Gef.: „ 38,26	„ 2,53	„ 30,50.

Die Rückstände I und II werden gemeinsam in 10 ccm siedenden Wassers mit 0,5 ccm 2n KOH gelöst und in 5 ccm siedende 2n HCl getropft. Ausbeute 10 mg Leukopterin = 27 % d. Th.

Hydrierung von Erythropterin

42 mg Erythropterin-Perchlorat wurden in 1 ccm Wasser mit 0,25 ccm 1,5 n NaOH gelöst und unter Wasserstoff mit Platin aus 51 mg PtO₂ geschüttelt. Nach 3 Stunden waren 2,6 ccm (1 Mol), nach 10 Stunden 4,6 ccm (1,8 Mol) H₂ aufgenommen. Die Lösung war farblos und die Aufnahme zum Stillstand gekommen.

Der Wasserstoff wurde abgepumpt und die farblose Lösung mit Sauerstoff geschüttelt. Dabei tritt alsbald die Farbe und typische Fluoreszenz des Xanthopterin-chromophors auf.

Erythropterin und o-Phenylendiamin

11 mg Erythropterin-sulfat und 18 mg o-Phenylendiamin werden in 5 ccm 0,6 n HCl aufgeköcht und 45 Min. im Dampfbad gehalten. Noch warm wird abgesaugt und mit Wasser gewaschen.

⁶) R. Purmann, A. 548, 284 (1941).

Ausbeute 9 mg feine violettbraune Nadelchen (90 % d. Th.), die sich wie Pterorhodin mit intensiv violetter Farbe in konz. Schwefelsäure lösen. Zur Analyse wurde die Substanz in 10 cem konz. Schwefelsäure gelöst, mit 5 cem kaltem Wasser und dann mit 30 cem warmem Wasser versetzt, und die auskristallisierten violetten Nadelchen mit Wasser und Alkohol gewaschen und über P_2O_5 im Xyloldampf getrocknet.

Gef. C 41,99	H 3,94	N 22,4	(vermutlich z. T. hydrolysiertes Sulfat)
Molekulares Verhältnis von C/N in Pterorhodin 1,30		
in einer Verbindung aus Erythropterin und o-Phenylendiamin	2,14		
Gef.:	2,19.		

Weitere Synthesen in der Reihe des 5,6 (N)-Pyrrhochinolins Über Strychnos-Alkaloide XXXI

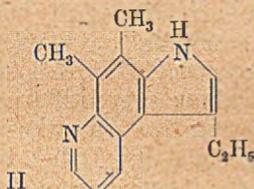
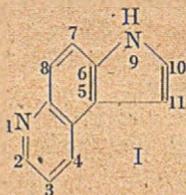
Von Rolf Huisgen

Mit 5 Figuren im Text

(Aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften zu München)

[Eingelaufen am 12. Dez. 1947]

Die ausgezeichnete spektrale Übereinstimmung des Vomipyryns mit dem 5,6(N)-Pyrrhochinolin (I) ermunterte trotz der Mißerfolge der ersten synthetischen Versuche¹⁾ zur Weiterarbeit auf der Grundlage dieses tricyclischen Systems, das ja auch von der damals als recht sicher betrachteten Strychninformel nach R. Robinson²⁾ gefordert wurde. Lag der Molekülrest C_2H_5 nicht in Gestalt einer Äthylgruppe in den Positionen 7 oder 8 vor, so blieb zunächst die Möglichkeit zweier Methylgruppen. Das auf dem üblichen Wege, ausgehend vom vic.o-Xylidin synthetisierte 7,8-Dimethyl-11-äthyl-5,6(N)-pyrrhochinolin (II) schmilzt um 120° höher als Vomipyryrin.



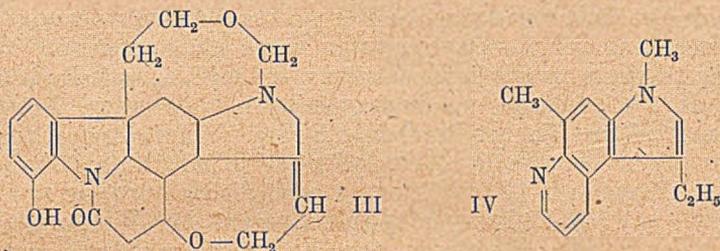
Der Nachweis von Methylimid im Vomipyryrin sowie die Aufklärung der Vorstufen seiner Bildung³⁾ legten eine Einfügung des für Vomycin

¹⁾ H. Wieland und L. Horner, A. 536, 89 (1938); L. Horner, A. 540, 73 (1940).

²⁾ Soc. 1939, 603.

³⁾ H. Wieland, R. Huisgen und R. Bubenik, A. 559, 191 (1948).

charakteristischen Strukturelements $-CH_2-O-$ in das Ringgerüst des Strychnins unter Ringerweiterung nahe, wie es Formel III als Arbeitshypothese zeigt. Für Vomipyrin würde sich die Konstitution eines 8,9-Dimethyl-11-äthyl-5,6(N)-pyrrochinolins (IV) ergeben, das ebenfalls



synthetisiert wurde. Die Einführung der N-Methylgruppe war auf der Stufe des Pyrrochinolins oder Chinolyl-6-hydrazins⁴⁾ nicht möglich wegen zu geringer Acidität des N-ständigen Wasserstoffs, gelang auf der Stufe des 6-Amino-8-methyl-chinolins über das Sulfamid. Die recht schwierige Reduktion des Nitrosamins zum sekundären Hydrazin konnte mit Aluminiumamalgam in Äther in mäßiger Ausbeute durchgeführt werden. Das Hydrazon der α -Keto-valeriansäure schließt schon mit wäßriger Salzsäure unter gleichzeitiger Abstoßung der Carboxylgruppe den Indolring zum Pyrrochinolin IV. Auf Grund der Erfahrungen über die Angliederung eines Pyrrolsystems an „naphtoide“ Bicyclen mittels der Fischer-Synthese⁵⁾ kann die angulare Anellierung in diesem Tricyclus keinem Zweifel unterliegen. IV gibt mit Vomipyrin kräftige Schmelzpunktsdepression⁶⁾ und zeigt abweichende Farbreaktionen⁷⁾.

Die Ähnlichkeit der UV-Absorption von Vomipyrin und 5,6(N)-Pyrrochinolin sowie die stark abweichenden Absorptionskurven des 5(N),6- und 7,8(N)-Pyrrochinolins¹⁾ ermutigten auch jetzt noch zur weiteren Prüfung der im gleichen tricyclischen System liegenden Möglichkeiten. Da Abbaubersuchen am Vomipyrin und Oxy-vomipyrin kein Erfolg beschieden war, blieb nur der mühevollen Weg der systematischen Alkylsubstitution des Pyrrochinolingerüsts. Ein sorgfältiger Vergleich der Indol-Farbreaktionen und des spektralen Verhaltens von

⁴⁾ Alkylierung des Phenylhydrazins über die Na-Verbindung nach Michaelis, B. 19, 2448 (1886); A. 252, 266 (1889); Titherley, Soc. 1897, 461; Crowther, Mann and Purdie, Soc. 1943, 63.

⁵⁾ R. Huisgen, A. 559, 105 u. 129 (1948).

⁶⁾ Die beim Indol beobachtete Erniedrigung des Schmp. bei N-Alkylierung tritt auch in der Pyrrochinolinreihe auf. IV schmilzt bei 90°, um 85 tiefer als die ebenfalls synthetisierte Nor-Verbindung, das 8-Methyl-11-äthyl-5,6(N)-pyrrochinolin.

⁷⁾ Als analytisches Kriterium für die N-Methylgruppe erweist sich der auch beim Vomipyrin beobachtete langsame Verlauf der Hopkins-Cole-Reaktion, die erst nach mehreren Stunden die volle Farbstärke aufweist.

insgesamt 30 synthetischen Pyrrochinolinbasen sollte Rückschlüsse auf die Substituentenverteilung im Vomipyrin gestatten.

Methodisch bot die präparative Arbeit wenig Neues. Alkylgruppen im Benzolkern müssen in geeignet substituierten p-Nitranilinderivaten in den Synthesegang eingeführt werden. Methylsubstitution in 10 ermöglicht die Zinkchloridschmelze der Aceton-chinolylylhydrazone. Bei der Darstellung von 11-Alkylderivaten liefert die Cyclisierung der α -Ketosaure-hydrazone mit konz. Salzsäure und nachfolgende Decarboxylierung der 10-Carbonsäuren nahezu quantitative Ausbeuten. Besonders leicht sind mit der Fischer-Synthese α,β -disubstituierte Indole zugänglich; kurzes Aufkochen der Chinolylylhydrazine mit Methyläthylketon oder Cyclohexanon in Eisessig führt in vorzüglicher Ausbeute zu 10,11-Dimethyl- bzw. 10,11-Tetramethylen-derivaten. Zur Einführung von Alkyl in den Pyridinteil wechselt man den Typus der Chinolinsynthese. Die Übertragung der Döbner-v. Millerschen Synthese auf das p-Nitranilin ermöglicht die Darstellung der Pyrro-chinaldine, die Synthese nach Blaise und Maire⁸⁾ die der 4-Alkyl-derivate.

Der Vergleich der Farbreaktion nach Hopkins und Cole bei den synthetischen Basen erlaubt den wichtigen Schluß, daß der Pyrrolteil des Vomipyrins unsubstituiert sein muß. Vergleichende C-Methyl-Bestimmungen in der Pyrrochinolin-Reihe sind im Experimentaltel beschrieben.

Die Lichtabsorption des 5,6(N)-Pyrrochinolins in Abhängigkeit von der Alkylsubstitution.

Mit dem Vomipyrin gemeinsam hat das 5,6(N)-Pyrrochinolin ein zweibandiges Absorptionsspektrum¹⁾. Die mehr oder minder große Verschiebung der Maxima bei Alkylsubstitution ist untypisch und diagnostisch nicht verwertbar.

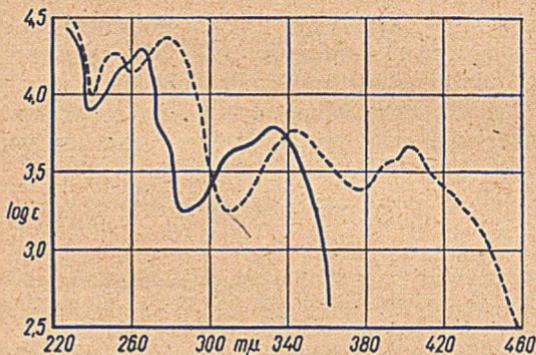


Fig. 1
5,6(N)-Pyrrochinolin
— Freie Base
- - - Chlorhydrat
in Alkohol

⁸⁾ Bl. 3, 658 (1908); J. Kenner und F. S. Statham, Soc. 1935, 299; B. 69, 16 (1936).

Im Gegensatz zu den einfachen Ringbasen, wo die Salzbildung sich lediglich in der Extinktion auswirkt, treten wesentliche spektrale Unterschiede auf beim Übergang der Pyrrochinolinbasen in ihre Chlorhydrate: Bathochrome Verschiebung, Auftreten eines neuen Absorptionsmaximums an der Grenze des Sichtbaren und zuweilen eine Aufspaltung des kurzwelligen Maximums, wie das Beispiel des unsubstituierten 5,6(N)-Pyrrochinolins zeigt (Fig. 1).

Spektrale Unterschiede zwischen Base und Salz treten nicht erst beim dreikörnigen System, sondern schon bei Aminen der Chinolinreihe (Fig. 2) auf, sind allgemein da zu erwarten, wo mit der Salzbildung eine Änderung der mesomeren Strukturen nach Zahl, Art und Beteiligung am Grundzustand verbunden ist.

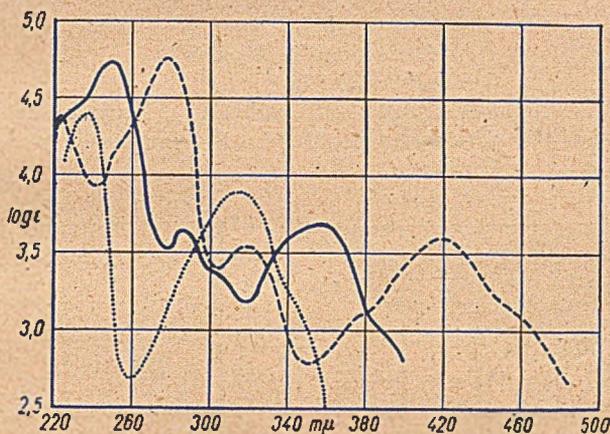


Fig. 2

6-Aminö-8-methyl-chinolin

- Freie Base (in Alkohol)
- - - - - Monochlorhydrat (in Alkohol)
- Lösung in 50proz. H₂SO₄

Das Absorptionsspektrum der Pyrrochinolin-salze (Fig. 3), insbesondere das für die gelbe Salzfarbe verantwortliche Maximum an der Schwelle des Sichtbaren zeigt eine überraschend hohe Abhängigkeit von der Alkylsubstitution. Beim Vomipyryn findet sich dieses Salzmaximum nur als Buckel im langwelligen Abfall angedeutet. Die colorimetrische Bestimmung der gelben Salzfarbe mittels geeigneter Farbfilter⁹⁾ ermöglicht die schnelle Erfassung des im Sichtbaren liegenden Teiles der Salzabsorption. Fig. 4 zeigt deutlich den auxochromen und

⁹⁾ S 43 S 47 und S 50 des Zeiß-Pulfrich-Photometers. Man erfaßt natürlich nicht die Extinktion am Filterschwerpunkt, sondern einen Durchschnittswert über Filterbreite. Die Werte der Tab. 1 und Fig. 4 und 5 sind nicht exakt, nur vergleichbar.

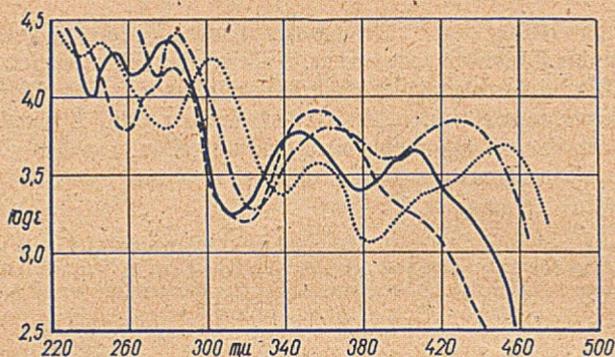


Fig. 3

Chlorhydrate in Alkohol:

- 5,6(N)-Pyrrochinolin
- 8-Methyl-10,11-tetramethylen-5,6(N)-pyrrochinolin
- - - - 8,9-Dimethyl-11-äthyl-5,6(N)-pyrrochinolin
- - - - Vomipyrin

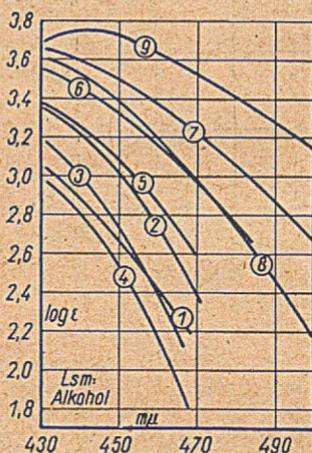


Fig. 4

Chlorhydrate von:

- (1) Vomipyrin
- (2) 5,6(N)-Pyrrochinolin
- (3) 2-Methyl-
- (4) 4-Methyl-
- (5) 7-Äthyl-
- (6) 8-Methyl-
- (7) 10-Methyl-
- (8) 11-Methyl-
- (9) 8-Methyl-10,11-tetramethylen-

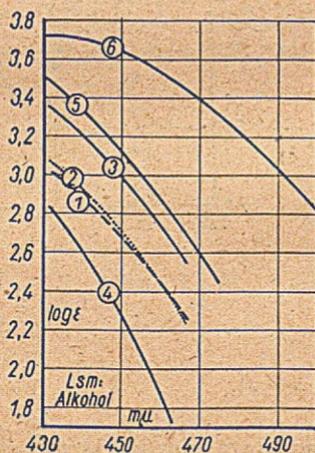


Fig. 5

- (1) Vomipyrin
- (2) Base $C_{16}H_{18}ON_2$
- (3) 5,6(N)-Pyrrochinolin
- (4) 4-Äthyl-7-methyl-
- (5) 4-Äthyl-8-methyl-
- (6) 8,9-Dimethyl-11-äthyl-

bathochromen Effekt jeder Alkylsubstitution im Benzol- oder Pyrrolteil der Molekel. Insbesondere Alkyl im Pyrrolkern verschiebt das Maximum über 420 m μ hinaus, ein Effekt, der auch bei Mehrfachalkylierung so unzweideutig ist, daß eine Äthylsubstitution der Stellung 11 für Vomipyrin nicht länger diskutabel ist.

Alkylierung des Pyridinteils führt überraschenderweise zu einer Verminderung der gelben Salzfarbe gegenüber dem unsubstituierten Stammkörper (Fig. 4 und Tab. 1). Dem 4-Äthyl-7-methyl- und 4-Äthyl-8-methyl-5,6(N)-pyrrochinolin ist das Vomipyrin in der Salzabsorption ähnlicher (Fig. 5) als allen anderen Isovomipyrinen. Der planmäßige Vergleich einer anderen optischen Eigenschaft der Pyrrochinoline gestattet aber, für das Vomipyrin eine Formel mit Alkyl im Pyridinkern auszuschließen. Die gelbgrüne UV-Fluoreszenz der Pyrrochinolin-salze

Tab. 1
Colorimetrische Bestimmung der gelben Salzfarbe

Extinktion	log ϵ 434 m μ	log ϵ 463 m μ	log ϵ 500 m μ
5,6(N)-Pyrrochinolin	3,31	2,65	
2-Methyl	3,13	2,29	
4-Methyl	2,93	2,04	0
7-Äthyl	3,33	2,79	
8-Methyl	3,52	3,11	
10-Methyl	3,64	3,33	2,68
11-Methyl	3,59	3,13	2,18
11-Äthyl	3,63	3,30	2,48
2,10-Dimethyl	3,61	3,14	2,27
4-Äthyl-7-methyl	2,76	1,73	0
4-Äthyl-8-methyl	3,44	2,80	0
4,10-Dimethyl	3,51	2,87	
7,8-Dimethyl	3,56	3,14	
7,11-Diäthyl	3,57	3,04	2,32
8-Methyl-11-äthyl	3,69	3,41	2,81
8,11-Diäthyl	3,44	2,80	
10,11-Dimethyl	3,72	3,60	3,15
10,11-Tetramethylen	3,73	3,64	3,18
2,10,11-Trimethyl	3,75	3,50	2,86
2-Methyl-10,11-tetramethylen	3,78	3,54	2,97
4-Äthyl-7,10-dimethyl	3,37	2,73	—
4-Äthyl-8,10-dimethyl	3,64	3,31	2,46
4-Methyl-10,11-tetramethylen	3,73	3,50	2,78
7,8,10-Trimethyl	3,60	3,50	
7,8-Dimethyl-11-äthyl	3,72	3,46	
8,9-Dimethyl-11-äthyl	3,72	3,49	2,82
8,10,11-Trimethyl	3,64	3,69	3,43
8-Methyl-10,11-tetramethylen	3,64	3,71	3,46
7,8,10,11-Tetramethyl	3,64	3,69	3,44
7,8-Dimethyl-10,11-tetramethylen	3,67	3,72	3,47
Vomipyrin	2,99	2,34	
Base C ₁₆ H ₁₈ ON ₂	3,03	2,32	

Reduktionslösung in warme 40proz. Kalilauge unbeschadet der Erhitzung. Einschütteln desamins in Chloroform, Reinigung an Aluminiumoxyd. Aus wäßrigem Methanol kristallisiert das Amin mit 97proz. Ausbeute. Aus Benzol zarte farblose Blättchen vom Schmp. 163°. Gelbes Chlorhydrat.

$C_{11}H_{12}N_2$ (172,12) Ber. N 16,28 Gef. N 16,54

Das Acetylderivat schmilzt bei 222°.

6-Hydrazino-7,8-dimethyl-chinolin. 10 g Amin werden in 100 ccm konz. Salzsäure und 50 ccm Wasser gelöst und mit 4,05 g Natriumnitrit in 100 ccm Wasser diazotiert. Die gelbe Diazoniumlösung wird in die eiskalte Lösung von 40 g Zinnchlorür in 40 ccm konz. Salzsäure und 600 ccm Wasser eingegossen und einige Stunden bei Raumtemp. belassen. Nach Verdünnen mit gleichem Volumen Wasser wird in der Siedehitze mit H_2S entzint. Beim Eindampfen i. V. zur Trockne scheidet sich das Hydrazin-chlorhydrat in gelben Kristallkrusten aus, die durch Digerieren mit 50proz. Methanol vom Kochsalz befreit werden. Die wäßrige Lsg. des Chlorhydrats reduziert Fehling'sche Lösung, bleibt auf Zusatz von Natriumacetat völlig klar. Mit Ammoniak wird das freie Hydrazin gefällt, das aus Methanol in farblosen Nadeln vom Schmp. 149° und Rotfärbung erhalten wird. Die freie Base zeigt den typischen Geruch der Chinolylhydrazine.

Das Hydrazon der α -Ketovaleriansäure wird durch Versetzen der wäßrigen Lösung des Hydrazin-chlorhydrats mit frisch dest. Ketovaleriansäure und Abstumpfen mit Natriumacetat erhalten. Das gelbe Hydrazon schmilzt bei 201° u. Zers.

Cyclisierung mit Zinkchlorid. 4 g Hydrazon werden in 12 g Zinkchlorid bei 210° eingetragen. Die zähe rote Schmelze entwickelt bei 230° Kohlendioxyd, wird noch 20 Minuten auf 260° erhitzt. Beim Digerieren der erkalteten Schmelze mit Wasser wird ein flockiges Chlorozinkat gefällt. Ohne dessen Isolierung wird mit Ammoniak übersättigt, mit Chloroform ausgezogen. Die getrocknete und gewaschene Chloroformlösung wird an einer kurzen Al_2O_3 -Säule entfärbt, eingengt, mit Aceton versetzt. Unter Aufarbeitung der Mutterlauge 1,14 g farblose seidige Nadeln vom Schmp. 214°, 36 % d. Th. Umkristallisierbar aus Aceton.

$C_{15}H_{16}N_2$ (224,15) Ber. C 80,30 H 7,19 N 12,50
Gef. „ 80,49 „ 7,21 „ 12,29.

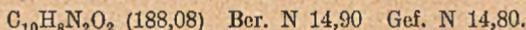
Das 7,8-Dimethyl-11-äthyl-pyrrochinolin sublimiert im HV gegen 140°, zeigt in Acetonlösung blaue UV-Fluorescenz. Hopkins-Cole-Reaktion siehe Seite 190. Der mit Salzsäure befeuchtete Fichtenspan wird grün gefärbt. Mit Ehrlichs Reagens keine Färbung. Das Chlorhydrat kristallisiert in orangeroten Nadeln.

Tetrahyroderivat. 0,5 g Base werden in 30 ccm Amylalkohol mit 2,8 g Natrium in kleinen Anteilen reduziert. Noch warm wird mit Wasser versetzt, der Amylalkohol mit Wasserdampf abgeblasen, mit Äther ausgezogen. Der Ätherlösung werden mit 2n-Salzsäure die basischen Anteile entzogen. Die freie Tetrahydro-pyrrochinolinbase geht im HV bei 130° Badtemp. als hellgelbes Öl über, das keine Kristallisationsneigung zeigt. Auf Zusatz von alkohol. Salzsäure zur Alkohollösung kristallisiert das farblose Chlorhydrat, das bei 315° unter Rotfärbung schmilzt. Die Farblosigkeit des Salzes zeigt, daß mit der Hydrierung des Pyridinkerns die chromophoren Eigenschaften verschwinden. Hopkins-Cole-Reaktion kräftig weinrot.

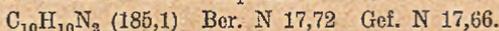
8,9-Dimethyl-11-äthyl-5,6(N)-pyrrochinolin

6-Nitro-8-methyl-chinolin wird aus 3-Nitro-6-amino-toluol mit Hilfe der Skraup'schen Synthese wie oben erhalten. Zweckmäßige Aufarbeitung: Die mit dem doppelten

Volumen Wasser versetzte Reaktionslösung scheidet über Nacht Schmier ab, von denen abgesehen wird. Das beim Alkalischemachen körnig ausfallende Nitrochinolin wird in 3*n*-Salzsäure gelöst und mit Tierkohle gekocht. Die filtrierte Lösung wird in der Wärme durch vorsichtigen Ammoniakzusatz auf pH 4,5–6 gebracht, wobei die schwach gelbbraun gefärbte Nitrobase auskristallisiert. Stark färbende Begleit-substanzen bleiben in der Mutterlauge. Aus Äthanol farblose verfilzte Nadeln vom Schmp 127–128°. Ausbeute an umkrist. Produkt 66% d. Th.

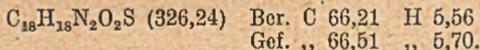


6-Amino-8-methyl-chinolin. 30 g Nitrobase werden portionsweise in Lsg. von 140 g Zinnchlorür in 270 ccm halbkonz. Salzsäure eingetragen, wobei unter Selbsterwärmung und Rotfärbung Reduktion stattfindet. Beim Einrühren der noch 1 Stunde auf dem Dampfbad erhitzten Lösung in überschüssige starke Kalilauge scheidet sich das Amin kristallin ab. Zur Entfernung kleiner Mengen ungelöster Zinnsäure wird noch einmal in 2*n*-Salzsäure gelöst und mit Alkali ausgefällt. Ausbeute 95% d. Th. Aus Benzol farblose Prismen vom Schmp. 125°.



*6-(*p*-Toluolsulfamid)-8-methyl-chinolin*. 10 g 6-Amino-8-methyl-chinolin und 12,5 g *p*-Toluolsulfchlorid werden in 30 ccm trockenem Pyridin 20 Minuten gekocht. Nach Entfernen des überschüssigen Lösungsmittels i. V. wird der zähflüssige Rückstand mit verd. Salzsäure digeriert, wobei er zum Kristallbrei erstarrt, der scharf abgesaugt, ausgewaschen und getrocknet wird. 21,4 g = 97% d. Th. am Chlorhydrat des Sulfamids. Mit der berechneten Menge Alkali wird das Sulfamid in Freiheit gesetzt, das nach Umkristallisieren aus Alkohol bei 101° schmilzt.

*6-(*p*-Toluol-sulfonyl-*N*-methyl-amino)-8-methyl-chinolin*. 21,4 g Sulfamid-chlorhydrat werden in 70 ccm warmer 2*n*-Natronlauge (2,2 Äquiv.) gelöst, dann bei 0°, später bei Raumtemp. mit 7 ccm Dimethylsulfat auf der Maschine geschüttelt. Das abgeschiedene alkali-unlösliche Methylierungsprodukt wird mit Natronlauge, dann mit Wasser gewaschen, nach dem Trocknen aus Alkohol umgelöst. Die farblosen Kristalle verwittern an der Luft und schmelzen bei 112°. Ausbeute 93% d. Th.



6-Methylamino-8-methyl-chinolin. 18,6 g des methylierten Sulfamids werden mit 55 ccm 85proz. Schwefelsäure 2 Stunden auf 135° erhitzt, dann auf Eis gegossen. Nach Alkalisieren wird in Chloroform aufgenommen, der Extrakt an Al_2O_3 entfärbt und eingengt. Die Base geht bei 110°/0,1 mm als blaßgelbes viskoses Öl über, das keinerlei Kristallisationstendenz zeigt und mit den üblichen Solventien mischbar ist. Das in viel Wasser emulgierte Öl kristallisiert beim Anreiben in verfilzten Nadeln durch. Es handelt sich um ein Hydrat, das schon beim Liegen an der Luft, schneller im Exsikkator das Wasser wieder abgibt und sich in die ölige Base zurückverwandelt.

6-Nitroso-methyl-amino-8-methyl-chinolin wird beim Behandeln des sekundären Amins mit Natriumnitrit in verd. salzsaurer Lösung erhalten. Sobald Kaliumjodid-stärkepapier gebläut wird, macht man alkalisch und nimmt in Chloroform auf. Der Rückstand der Chloroformlösung kristallisiert aus 90proz. Alkohol in lachsroten Tafeln. Die färbende Verunreinigung kann durch Destillation entfernt werden, wobei das Nitrosamin bei 140° und 0,1 mm Druck als blaßgelbes Öl übergeht, das kristallin erstarrt. Schmp. 88°. Ausbeute über 95%. Liebermann-Reaktion tiefrot, bald in blau umschlagend.



Die Spaltung des Nitrosamins mit Cuprochlorid in kalter Salzsäure liefert glatt das sekundäre Amin zurück.

6-N-Methyl-hydrazino-8-methyl-chinolin. Die Reduktion des Nitrosamins mit Zinkstaub in Essigsäure, mit Hydrosulfit in Eisessig, mit Schwefeldioxyd und Zink-

staub in Eisessig oder wäßriger Essigsäure, mit Magnesiumpulver in Alkohol und wenig Essigsäure führte stets zu einem autoxydablen Reaktionsprodukt ohne reduzierende Eigenschaften gegenüber Fehlingscher Lösung. Ammoniumsulfid greift überhaupt nicht an; Zinnchlorür spaltet unter allen Bedingungen die Nitrosaminbindung und liefert das sekundäre Amin.

4 g reines Nitrosamin werden in 250 ccm Äther gelöst, mit Aluminiumamalgam aus 10 g Al-spänen versetzt. Die unter Stickstoff vorgenommene Reduktion muß anfangs durch Einstellen in kaltes Wasser gemäßigt werden. Unter ständigem Schütteln alle Viertelstunde einige Tropfen Wasser zufügen. Nach 4 Stunden ist die Reaktion beendet, wie die negative Reaktion mit Diphenylamin-Schwefelsäure zeigt. Der Aluminiumhydroxyd-schlamm wird ausgewaschen, die Filtrate eingeeengt und im HV destilliert. Bei 90° beginnt sekundäres Amin überzugehen, schon mit Hydrazin verunreinigt, wie das Reduktionsvermögen gegenüber Fehlingscher Lösung zeigt. Das Destillat bei 150° wird in 2n-Salzsäure aufgenommen, die rote Lösung i. V. zur Trockne gebracht. Nach Aufnehmen in wenig siedendem Methanol kristallisiert das Chlorhydrat des sekundären Hydrazins aus. Aus der Mutterlauge können erhebliche Mengen sekundäres Amin zurückgewonnen werden. Die Anfarbeitung des methanologischen Auszugs des Aluminiumhydroxydschlammes nach gleichem Verfahren ist lohnend. Ausbeute an Hydrazinchlorhydrat ist schwankend, beträgt maximal 8% d. Th.

Die Hydrolysentrennung von stark und schwach basischen Anteilen versagt, da bei der Fällung mit Natriumacetat stark basische Anteile stets mit in den Niederschlag gerissen werden. Für die Hydrazin-Ausbeute entscheidend ist vor allem die schnelle Durchführung der Reduktion.

Das Hydrazon der α -Ketoverliansäure, auf die übliche Weise hergestellt, ist gelb und schmilzt bei 220° unter Gasentwicklung. Das orangefarbene Chlorhydrat ist schwer löslich in Wasser.

Indolringschluß. Die Zinkchloridschmelze führt zu einem stark verschmierten Produkt, aus dem mit Pikrinsäure eine bescheidene Menge des Pyrrochinolins gefällt werden kann. Ungleich geeigneter ist die Cyclisierung mit Salzsäure.

137 mg Hydrazon werden in 3 ccm konz. Salzsäure erwärmt; das sich zunächst ausscheidende Chlorhydrat geht bald in Lösung. Nach 5 Minuten Kochen wird die klare Lösung im Vakuumexsikkator über Ätzkali zur Trockne gebracht. Das zurückbleibende orangefarbene kristalline Chlorhydrat wird mit Ammoniak zerlegt, die Base durch HV-Destillation gereinigt. Bei 110–120° Badtemp. geht farbloses Öl über, das völlig kristallin erstarrt. Ausbeute 99 mg = 92% d. Th. Nach mehrfachem Umlösen aus Äther-Petroläther liegt der Schmp. bei 90°. Die Mischung mit Vomipyridin sintert bei 63°, schmilzt bei 70°.

$C_{15}H_{16}N_2$ (224,15)	Ber. C 80,30	H 7,19	N 12,50	NCH_3 12,9
	Gef. „ 80,57	„ 7,35	„ 12,65	„ 10,7.

Bei der Darstellung einer großen Zahl weiterer Pyrrochinolinabkömmlinge wurde stets der Pyrrolring wie bisher mit Hilfe der Fischerischen Synthese angegliedert. Zur Vermeidung von Überschneidungen seien zunächst die Synthesen der noch nicht bekannten Hydrazinochinoline beschrieben, dann deren Cyclisierung zu Abkömmlingen des 5,6(N)-Pyrrochinolins.

Synthese von Chinolyl-hydrazinen

2-Methyl-6-hydrazinochinolin

6-Nitro-2-methyl-chinolin wird durch Chinaldinisierung des p-Nitranilins dargestellt. Eine Abtrennung überschüssigen Amins erübrigt sich. 20 g p-Nitranilin werden mit 20 ccm frisch dest. Paraldehyd und teilweise mit 32 ccm konz. Salzsäure versetzt. Das Amin geht unter Selbsterwärmung in Lösung; die klare Lösung

trübt sich, wobei der Geruch des Crotonaldehyds auftritt. Reaktion durch Einstellen in kaltes Wasser mäßigen. Nach Beendigung der Umsetzung durch zweistündiges-Rückflußkochen wird in Überschuß eisgekühlten Ammoniaks eingegossen. Die dunkle Fällung wird abgesaugt und mit 200 ccm 3*n*-Salzsäure aufgeköcht, wobei sich schwarze Schmierer abscheiden, von denen abgessen wird. Die mit Tierkohle gekochte Lösung wird erneut ammoniakalisch gemacht und mit Chloroform ausgezogen. Die auch nach Passieren einer Aluminiumoxyd-Säule noch gefärbte Lösung hinterläßt beim Eindampfen einen kristallinen Rückstand, aus dem mit wenig kaltem Methanol die schwarzbraunen Schmierer herausgelöst werden können. Nach mehrfacher Waschen mit Methanol bleiben 10,8 g recht reine Kristalle zurück. Aus den Mutterlauge durch mehrfaches Umlösen noch 0,9 g. Wiederholte Kristallisation aus 80proz. Methanol führt zu farblosen Nadeln vom Schmp. 165°. Ausbeute 43%. Ein Zusatz von Arsensäure als Oxydationsmittel hat keine Ausbeuteverbesserung zur Folge.

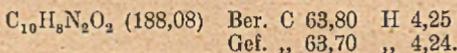
6-Amino-2-methyl-chinolin entsteht bei der Reduktion des Nitrokörpers mit Zinnchlorür in Salzsäure in der üblichen Weise. Das Amin besitzt eine ungewöhnliche Kristallisationstendenz. Die Chloroformlösung darf nicht zu stark eingengt werden, da sonst explosionsartig Kristallisation einsetzt. Aus 60proz. Alkohol in derben, zentimeterlangen Spießen vom Schmp. 187°.



Die Überführung in das 6-Hydrazino-2-methyl-chinolin erfolgt in der üblichen Weise. Das in Wasser leicht lösliche Chlorhydrat des Hydrazins ist blaßgelb gefärbt. Die farblosen Nadeln der freien Base schmelzen bei 156°.

4-Methyl-6-hydrazino-chinolin

6-Nitro-4-methyl-chinolin. Das benötigte β -Chloräthyl-methyl-eton wird in Anlehnung an das Schering-Kahlbaum-Patent C. 1929, I. 143 durch Addition von Acetylchlorid an Äthylen in Gegenwart von AlCl_3 dargestellt. 8,5 g p-Nitranilin, 5 ccm abs. Alkohol, 3 g 1-Chlorbutanon-(3) und 10 g Zinntetrachlorid-trihydrat werden gemischt und unter Wasserabschluß 3 Stunden auf siedendem Wasserbad erwärmt. Die dunkelrote Reaktionslösung wird in einen Überschuß 30proz. Natronlauge eingegossen. Die abgesaugte graugrüne Fällung wird in 3*n*-Salzsäure mit Tierkohle aufgeköcht, von dunklem Harz abfiltriert, alkalisch gemacht und mit Chloroform durchgeschüttelt. Der größte Teil des überschüssigen p-Nitranilins bleibt dabei ungelöst. Der Rückstand der eingedampften Chloroformlösung wird mit 20 ccm Acetanhydrid 10 Minuten gekocht, der Überschuß i. V. abgezogen. Beim Ausziehen mit 3*n*-Salzsäure bleibt Acetyl-p-nitranilin ungelöst. Der saure Auszug wird mit Ammoniak-Chloroform aufgearbeitet, der Chloroformextrakt an Al_2O_3 gereinigt und eingengt. Als Alkohol nahezu farblose Spieße vom Schmp. 130°. Unter Aufarbeitung der Mutterlauge 1,82 g, entsprechend 31% d. Th., bezogen auf das Chlorketon. Farbloses Chlorhydrat.



6-Amino-4-methyl-chinolin. Aus 50proz. Methanol farblose Stäbchen vom Schmp. 171°. Gelbes Chlorhydrat. Das wie üblich hergestellte 6-Hydrazino-4-methyl-chinolin kristallisiert in farblosen Nadeln vom Schmp. 146°. Das Chlorhydrat ist nur schwach gelblich gefärbt.

6-Hydrazino-4-äthyl-8-methyl-chinolin

β -Chloräthyl-äthyl-eton. 80 g feingepulvertes AlCl_3 werden mit 60 ccm frisch dest. Schwefelkohlenstoff versetzt. Nach Zusatz von 45 g Propionylchlorid wird in die lebhaft turbinierte breiige Mischung unter Kühlung mit Eis-Kochsalz Äthylen eingeleitet, wobei das Reaktionsgemisch leichtflüssig wird. Nach Einleiten des Doppelten der theoretischen Äthylenmenge wird mit Eis zersetzt und mit Äther durch-

geschüttelt. Der Extrakt wird mit Bicarbonat entsäuert, getrocknet, auf dem Wasserbad eingengt, der Rückstand i. V. destilliert, wobei 11,4 g des Chlorketons bei 65°/22 mm übergehen.

6-Nitro-4-äthyl-8-methyl-chinolin. 9 g Nitro-toluidin ($\text{CH}_3\text{:NH}_2\text{:NO}_2 = 1:2:5$), 7,5 g Zinntetrachlorid-trihydrat werden mit 3 ccm abs. Alkohol und 3 g 1-Chlor-pentanon-(3) zunächst 2 Stunden auf 100°, dann weitere 2 Stunden auf 130° erhitzt. Noch heiß wird mit 20 ccm siedender halbkonz. Salzsäure digeriert, in Kalilauge eingegossen, die Fällung in 100 ccm 4n-Salzsäure aufgekocht, von schwarzen Schmierern abgossen, mit Tierkohle behandelt und mit Ammoniak ausgefällt. Das überschüssige Nitrotoluidin wird durch Acetylierung entfernt. Dazu wird 1 Stunde mit 35 ccm Acetanhydrid gekocht, der Überschuß i. V. abdestilliert, der zähe braune Rückstand in Chloroform aufgenommen. Nach einigem Stehen wird die vom auskristallisierten Acetylderivat abgesaugte Chloroformlösung mit 3n-Salzsäure ausgeschüttelt, der saure Extrakt wieder mit Ammoniak-Chloroform aufgearbeitet. Aus Methanol kristallisiert das Nitrochinolinderivat in derben Blöckchen: 2,14 g = 39% d. Th. bez. auf Chlorketon. Schmp. 129°.

$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ (216,12) Ber. C 66,63 H 5,60
Gef. „ 66,62 „ 6,12.

6-Amino-4-äthyl-8-methyl-chinolin wird bei der Zinnchlorür-Reduktion in 95proz. Ausbeute erhalten. Farblose Nadeln vom Schmp. 145°. Das Diazoniumsalz wird mit Zinnchlorür zum **6-Hydrazino-4-äthyl-8-methyl-chinolin** reduziert, das als blaß orange gefärbtes Chlorhydrat anfällt.

6-Hydrazino-4-äthyl-7-methyl-chinolin

6-Nitro-4-äthyl-7-methyl-chinolin wird aus 2-Nitro-5-amino-toluol wie oben dargestellt, wobei die Ausbeute 18% beträgt. Aus Methanol farblose Nadeln vom Schmp. 117°.

$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ (216,12) Ber. C 66,63 H 5,60
Gef. „ 66,92 „ 5,45.

6-Amino-4-äthyl-7-methyl-chinolin aus Methanol. Schmp. 162°.

6-Hydrazino-4-äthyl-7-methyl-chinolin. Die bei den 4-Alkyl-pyrrochinolinen beobachtete geringe gelbe Salzfarbe wird auch schon beim Hydrazinsalz konstatiert, das nur noch blaßgelblich und in überschüssiger Salzsäure schwerlöslich ist. Das Chlorhydrat zersetzt sich gegen 260°. Schmp. der freien Hydrazinbase 176°.

6-Hydrazino-8-methyl-chinolin

6-Hydrazino-8-methyl-chinolin wird aus dem S. 182 beschriebenen Amin wie üblich gewonnen. Orange gelbes Chlorhydrat. Das freie Hydrazin kann aus viel Benzol umgelöst werden zu Nadeln vom Schmp. 141°.

Indolringschluß mit Hilfe der Fischerschen Synthese

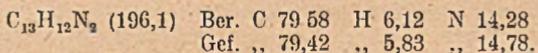
A) **Ringschluß zum 10,11-unsubstituierten 5,6(N)-Pyrrochinolin** bewirkt man durch Cyclisierung des Brenztraubensäureester-hydrazons in der Zinkchloridschmelze.

7,8-Dimethyl-5,6(N)-pyrrochinolin. Brenztraubensäure-hydrazon: Die warme wäßrige Lösung des Chlorhydrats des 6-Hydrazino-7,8-dimethyl-chinolins wird mit überschüssiger Brenztraubensäure versetzt, nach kurzem Stehen mit Natriumacetat das Hydrazon ausgefällt. Orangerote Nadeln, die gegen 200° unter Gasentwicklung schmelzen.

Esterhydrazon. 1,5 g trocknes Hydrazon werden in 15 ccm abs. Alkohol suspendiert, nach Zusatz von 1 ccm Schwefelsäure unter Rückfluß gekocht, wobei das

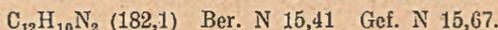
Hydrazon im Laufe von 2 Stunden in Lösung geht. Das zitronengelbe Sulfat des Esterhydrazons wird abgesaugt und mit Ammoniak zerlegt. Schmp. 104°. Ausbeute 80% d. Th.

Ringschluß. Das trockene Esterhydrazon wird portionsweise eingetragen in das 4fache Gewicht frisch entwässerten, feingepulverten, auf 180° erhitzten Zinkchlorids, wobei eine orangefarbene Schmelze resultiert. Bei 230° setzt die Reaktion ein, die sich in Abspaltung von CO₂ und Äthylen kundtut. Die Badtemperatur wird innerhalb einer Stunde auf 270° gesteigert. Die erkaltete Schmelze wird mit Wasser verrieben, mit Ammoniak-Chloroform aufgearbeitet. Aus sehr wenig Aceton kristallisiert die Pyrrochinolinbase in farblosen Polyedern vom Schmp. 187°.

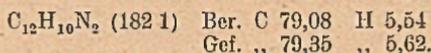


Völlig analog werden hergestellt:

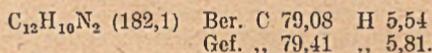
8-Methyl-5,6(N)-pyrrochinolin kristallisiert aus kleinem Volumen Aceton in farblosen wetzsteinförmigen Kristallen vom Schmp. 185°.



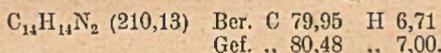
2-Methyl-5,6(N)-pyrrochinolin. Aus wenig Aceton an den Enden verdickte Stäbchen, die bei 220° schmelzen. Ausbeute bei der Cyclisierung 58% d. Th.



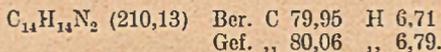
4-Methyl-5,6(N)-pyrrochinolin. Umkristallisierbar aus wenig Aceton zu farblosen Polyedern vom Schmp. 228°.



4-Äthyl-7-methyl-5,6(N)-pyrrochinolin wird bei der Cyclisierung mit 78% Ausbeute erhalten. Aus Aceton-Chloroform farblose, verfilzte Nadeln vom Schmp. 217°. Das Chlorhydrat kristallisiert aus Methanol-Aceton in hellgelben Nadeln.

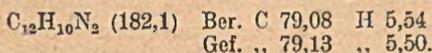


4-Äthyl-8-methyl-5,6(N)-pyrrochinolin. Aus Aceton farblose Stäbchen vom Schmp. 166°.



B) Ringschluß zum 10-substituierten Pyrrochinolin-Derivat wird durch Zinkchloridschmelze des Aceton-hydrazons erzielt.

10-Methyl-5,6(N)-pyrrochinolin. Das Chlorhydrat des 6-Hydrazinochinolins wird in wäßriger Lösung mit Aceton umgesetzt. Auf Natriumacetatzusatz hin scheidet sich das schwach gelbe Hydrazon aus. Schmp. 161°. 1 g trockenes Hydrazon werden mit 4,5 g frisch entwässertem und gepulvertem Zinkchlorid bei 180° verrieben. Die Schmelze wird im Laufe einer Stunde auf 270° erhitzt, diese Temp. 30 Minuten gehalten. Aufarbeitung mit Ammoniak-Chloroform. Die an einer kurzen Al₂O₃-Säule gereinigte Lösung hinterläßt einen kristallinen Eindampfrückstand, der aus kleinem Volumen Aceton zu farblosen Polyedern vom Schmp. 198° umkristallisiert wird.



2,10-Dimethyl-5,6(N)-pyrrochinolin wird aus Aceton-Benzol kristallisiert. Schmp. 166°. Das in Wasser schwer lösliche Chlorhydrat kristallisiert in goldgelben seidigen Nadeln.

4,10-Dimethyl-5,6(N)-pyrrochinolin. Aus Aceton-Wasser in farblosen Polyedern vom Schmp. 207°.

7,8,10-Trimethyl-5,6(N)-pyrrochinolin wird aus wenig Methanol in farblosen Blättchen erhalten, die bei 177—178° schmelzen.

$C_{14}H_{14}N_2$ (210,13) Ber. C 79,95 H 6,71
Gef. ,, 80,06 ,, 6,58.

4-Äthyl-7,10-dimethyl-5,6(N)-pyrrochinolin. Aus Aceton-Äther farblose Nadeln vom Schmp. 182°.

4-Äthyl-8,10-dimethyl-5,6(N)-pyrrochinolin kristallisiert aus Aceton-Äther in farblosen zarten Blättchen vom Schmp. 196°.

$C_{15}H_{16}N_2$ (224,15) Ber. C 80,30 H 7,19
Gef. ,, 80,68 ,, 6,96.

C) Ringschluß zum 11-substituierten Pyrrochinolin-Derivat. Die Cyclisierung der Hydrazone der α -Ketosäuren verläuft mit wäßriger Salzsäure wesentlich sauberer und mit besseren Ausbeuten als die Chlorzschmelze.

11-Methyl-5,6(N)-pyrrochinolin. Aus Chinolyl-6-hydrazin und α -Ketobuttersäure wird ein orangefarbiges Hydrazon vom Schmp. 190° u. Zers. erhalten. 1 g Hydrazon wird mit 5 ccm konz. Salzsäure übergossen. Das zunächst ausfallende gelbe Hydrazon-chlorhydrat geht beim gelinden Erwärmen in Lösung. Nach 10 Minuten Wasserbad ist die Lösung zu einem Brei gelber, seidiger Nadeln erstarrt. Der größte Teil der Salzsäure wird aus siedendem Wasserbad abgedampft. Dann wird in 70 ccm kochendem Wasser aufgenommen und mit Natriumacetat versetzt. 0,87 g = 94% d. Th. der in allen Lösungsmitteln schwer löslichen Pyrrochinolin-carbonsäure fallen mikrokristallin aus. Schmp. 265°. Die Decarboxylierung wird durch Erhitzen im Wasserstrahlvakuum auf 250° vorgenommen. Temp. nicht über 260° steigern, da die Reaktion nach dem Schmelzen der Carbonsäure zu heftig wird. Die Substanz befindet sich in einer kleinen Retorte; im Zuge der Decarboxylierung geht die Base als farbloses, kristallin erstarrendes Öl über. Die Ausbeute ist quantitativ. Das Destillat wird aus Aceton umgelöst zu farblosen, derben Spießen vom Schmp. 196°.

$C_{12}H_{10}N_2$ (182,1) Ber. C 79,08 H 5,54
Gef. ,, 79,38 ,, 5,26.

8-Methyl-11-äthyl-5,6(N)-pyrrochinolin. Das 8-Methyl-chinolyl-6-hydrazon der α -Ketovaleriansäure ist orangefarbig und schmilzt gegen 200° u. Zers. Die Cyclisierung mit Salzsäure wie oben führt zur 8-Methyl-11-äthyl-pyrrochinolin-10-carbonsäure, die aus viel Methanol zu farblosen Nadeln vom Schmp. 243° umgelöst wird.

$C_{15}H_{14}N_2O_2$ (254,13) Ber. C 70,83 H 5,55
Gef. ,, 71,10 ,, 5,63.

Decarboxylierung durch Destillation bei 240°/12 mm. Aus wenig Methanol farblose, bei 175° schmelzende Polyeder.

$C_{14}H_{14}N_2$ (210,13) Ber. C 79,95 H 6,71 N 13,33
Gef. ,, 80,00 ,, 6,73 ,, 13,37.

D) Ringschluß zum 10,11-disubstituierten Pyrrochinolin-Derivat. Die Cyclisierung der Hydrazone von Ketonen des Typs Cyclohexanon oder Methyl-äthyl-keton erfolgt sehr leicht mit den verschiedensten Kondensationsmitteln: mit Mineralsäure, mit Eisessig, mit katalytischen Mengen Nickelchlorid usf. Eine Übersicht über die Methoden zur Darstellung des

8-Methyl-10,11-tetramethylen-5,6(N)-pyrrochinolins ist an anderer Stelle¹²⁾ gegeben. Am vorteilhaftesten ist die Eisessig-Methode.

10,11-Tetramethylen-5,6(N)-pyrrochinolin. 1 g 6-Hydrazinö-chinolin-chlorhydrat werden mit 3 ccm Eisessig und 1 ccm Cyclohexanon zum Sieden erhitzt. Nach sechsstündigem Kochen haben sich rote Kristallkrusten ausgeschieden, die nach dem Erkalten abgesaugt und in viel warmem Wasser gelöst werden. Die mit Ammoniak ausgefüllte Base wird in Chloroform aufgenommen, die gewaschene und getrocknete Chloroformlösung an Aluminiumoxyd entfärbt und eingengt. Aus Aceton glasklare Polyeder vom Schmp. 202°. Ausbeute 70% d. Th. Rotes Chlorhydrat.

$C_{15}H_{14}N_2$ (222,13) Ber. C 81,03 H 6,35
Gef. ,, 81,34 ,, 6,62.

10,11-Dimethyl-5,6(N)-pyrrochinolin, analog dargestellt unter Ersatz des Cyclohexanons durch Methyl-äthyl-keton, kristallisiert aus wenig Aceton in farblosen Nadeln vom Schmp. 224°.

7,8-Dimethyl-10,11-tetramethylen-5,6(N)-pyrrochinolin wird aus dem bei 135° schmelzenden 7,8-Dimethyl-chinoly-6-hydrazon des Cyclohexanons in der Zinkchloridschmelze mit 73proz. Ausbeute gebildet. Etwa ebenso ergiebig ist das Eisessigverfahren. Nach Umlösen aus Alkohol Schmp. 239°. Rotes Chlorhydrat.

$C_{17}H_{18}N_2$ (250,2) Ber. C 81,53 H 7,25 N 11,20
Gef. ,, 81,53 ,, 7,10 ,, 11,04.

Zu Vergleichszwecken wurde die Substanz mit Palladium bei 250° zum Pyridocarbazol-derivat dehydriert. Die Farbintensität des Chlorhydrats ist geringer als die des Tetrahydroderivats. Das Dimethyl-pyrido-carbazol wird aus Methanol umgelöst zu farblosen Nadeln vom Schmp. 271°.

$C_{17}H_{14}N_2$ (246,15) Ber. C 82,88 H 5,73
Gef. ,, 82,59 ,, 5,59.

7,8,10,11-Tetramethyl-5,6(N)-pyrrochinolin. Nach dem Eisessigverfahren mit 91% Ausbeute erhalten. Farblose Nadeln aus Alkohol. Schmp. 201°.

2-Methyl-10,11-tetramethylen-5,6(N)-pyrrochinolin. Schmp. 211°.

$C_{18}H_{18}N_2$ (236,15) Ber. C 81,30 H 6,83
Gef. ,, 81,45 ,, 6,78.

2,10,11-Trimethyl-5,6(N)-pyrrochinolin. Aus Aceton-Wasser farblose Kristalle vom Schmp. 186°.

4-Methyl-10,11-tetramethylen-5,6(N)-pyrrochinolin. Umlösen aus 80proz. Methanol zu farblosen Nadeln vom Schmp. 220°.

$C_{19}H_{18}N_2$ (236,15) Ber. C 81,30 H 6,83
Gef. ,, 81,58 ,, 6,54.

8,10,11-Trimethyl-5,6(N)-pyrrochinolin wird aus Alkohol umgelöst und schmilzt bei 188°.

$C_{14}H_{14}N_2$ (210,12) Ber. N 13,33 Gef. N 13,33.

C-Methyl-Bestimmungen in der Pyrrochinolinreihe¹³⁾

wurden ausgeführt mit dem Ziel, Aussagen zu ermöglichen über die Verteilung der Substituenten auf die verschiedenen Kerne im Vompin. Auf Grund der Oxydationsempfindlichkeit des Pyrrolringes war

¹²⁾ A. 559, 144 (1948).

¹³⁾ Methode nach R. Kuhn u. F. L'Orsa, Ang. 44, 847 (1931); R. Kuhn u. H. Roth, B. 66, 1274 (1933). Dem KWI. für medizinische Forschung in Heidelberg bin ich für die Ausführung der Bestimmungen zu Dank verpflichtet.

zu erwarten, daß bei der Chromsäure-Schwefelsäure-Oxydation zuerst der Kern aufgespalten würde, Methyl im Pyrrolkern folglich recht hohe Essigsäurewerte lieferte. Methyl am Benzol- oder Pyridinkern sollte der Oxydation anheimfallen. Toluol wird vornehmlich zu Benzoesäure, Picolin zu Picolinsäure oxydiert. Für Äthylsubstitution sind ähnliche Ergebnisse zu erwarten wie für Methyl; Äthylbenzol wird über Acetophenon zu Benzoesäure oxydiert. Noch größere Alkylsubstituenten dürften in jedem Fall große Mengen Essigsäure liefern.

	mg Substanz	ccm n/100 NaOH	% von 1 Mol Essigsäure
2-Methyl-5,6(N)-pyrrochinolin	13,524	3,27	44,0
	14,394	3,53	44,7
8-Methyl-5,6(N)-pyrrochinolin	13,530	3,63	48,9
	15,324	0,433	5,2
10-Methyl-5,6(N)-pyrrochinolin	14,941	0,417	5,1
	13,464	5,19	70,2
11-Methyl-5,6(N)-pyrrochinolin	10,758	4,12	69,9
	16,775	6,53	70,9
7,11-Diäthyl-5,6(N)-pyrrochinolin	11,527	4,30	68,0
	12,967	9,92	171,5
	7,933	5,95	168,0

Unvorhergesehen und überraschend ist die Tatsache, daß Methyl am Pyridinkern (2-Methyl-) mehr Essigsäure liefert als am Benzolkern (8-Methyl-). Der hohe Wert für das 7,11-Diäthyl-Derivat lehrt, daß Äthyl und Methyl nicht in Parallele gesetzt werden dürfen; Anscheinend liefert der Typus des Arylmethyl-ketons in Nebenreaktion auch Essigsäure bei der Weiteroxydation. Auf Grund des oben Gesagten ist die Aufteilung der 170% nicht gleichmäßig auf beide Äthylgruppen vorzunehmen; vermutlich liefert 11-Äthyl mehr als 7-Äthyl.

Die Hopkins-Cole-Reaktion in der 5,6(N)-Pyrrochinolin-Reihe

Die Verwertung der Farbreaktion nach Hopkins-Cole als diagnostisches Hilfsmittel zur Festlegung der Alkylsubstitution im Pyrrochinolinkern ist an die Einhaltung exakt gleicher Bedingungen gebunden. Die Farbreaktion ist sehr abhängig vom Reinheitsgrad der verwendeten Reagentien. Während der techn. Eisessig genügend Glyoxylsäure enthält, bedarf Eisessig p. a. (Kahlbaum) des Zusatzes wäßriger Glyoxylsäure. Jedoch treten auch hier noch Unterschiede auf. Vomipyrin in Eisessig plus wäßriger Glyoxylsäurelösung liefert beim Unterschichten mit konz. Schwefelsäure einen unscheinbaren roten Ring. Bei der Probe mit techn. Eisessig ohne wäßrige Glyoxylsäure tritt unter dem schmalen roten Ring ein intensiverer grünblauer Ring auf. Bei der „Schichtprobe“ stellt der Endzustand sich meist erst nach Stundenfrist ein. Bei der Mischprobe erfolgt infolge der Erwärmung die Farbstoffbildung schneller.

Schichtprobe. 0,1—0,2 mg Base werden in 1 ccm techn. Eisessig gelöst und mit 1 ccm Schwefelsäure unterschichtet. Wenn mehrfarbige Ringe auftreten, sind die Farben in der Tabelle untereinander angegeben.

Mischprobe. 0,1 mg Base in 0,5 ccm Eisessig lösen und mit 1 ccm Schwefelsäure mischen.

Substanz	Schichtprobe		Mischprobe	
	nach 5 Min.	nach 5 Std.	nach 5 Min.	Intensität
Vomipyrin	blaß lilarot grünblau	lilablau	lila	++
Base C ₁₆ H ₁₈ ON ₂	rötlich blaß blaugrün	lila	lila	++
Oxy-vomipyrin	rötlich kräftig grün	blau	blaugrün	+++
C ₁₈ H ₁₆ O ₂ N ₂	rötlich grünblau	blauviolett	grün	+++
5,6(N)-Pyrrochinolin	rötlich	lilarot	lilarot	+
2-Methyl-5,6(N)-pyrrochinolin	rot	lilarot	lilarosa	+
4-Methyl-5,6(N)-pyrrochinolin	rotviolett	blauviolett	violett	+++
7-Äthyl-5,6(N)-pyrrochinolin	rötlich	lilarot	lilarot	++
8-Methyl-5,6(N)-pyrrochinolin	schwach lila	schw. violett	lila	++
10-Methyl-5,6(N)-pyrrochinolin	keine Färbg.	s.schw. orange	blaßgelb	fast 0
11-Methyl-5,6(N)-pyrrochinolin	stark rot	blaugrün rotviolett	rotviolett	++++
7,11-Diäthyl-5,6(N)-pyrrochinolin	kräftig blau „ lilarot	kräftig blau „ violett	blau	++++
8-Methyl-11-äthyl-5,6(N)-pyrrochinolin	kräftig blau „ rot- violett	kräftig blau „ violett	blaugrün	++++
7,8-Dimethyl-11-äthyl-5,6(N)-pyrrochinolin	st. blaugrün violett	kräftig blau	blaugrün	++++
8,9-Dimethyl-11-äthyl-5,6(N)-pyrrochinolin	mäßig blau- grün	stark blau	grünblau	++++
4-Äthyl-8-methyl-5,6(N)-pyrrochinolin	lilaviolett	stark blau	rotstichig blau	+++
4-Äthyl-7-methyl-5,6(N)-pyrrochinolin	blauviolett	stark violett	violett	+++
2,10-Dimethyl-5,6(N)-pyrrochinolin	blaß gelbrot	oliv	gelborange	fast 0
7,8,10-Trimethyl-5,6(N)-pyrrochinolin	blaß rötlich	rötlich	rosa	+

10,11-Dimethyl- und 10,11-Tetramethylen-5,6(N)-pyrrochinolin und Derivate geben wie alle α,β -disubstituierten Indole keine Farbreaktion. Bei der Mischprobe tritt lediglich die gelbe Farbe der Salze auf.

Basen mit besetzter 10 Stellung geben eine äußerst schwache oder gar keine Hopkins-Cole-Reaktion, Alkyl in 11 führt zu kräftig blauen Tönen. Vomipyrin zeigt die mäßig intensive Farbreaktion der Bz-substituierten Pyrrochinoline. Die Stellungen 10 und 11 sind sicherlich frei.

Die Erwartung, daß lediglich Substituenten im Pyrrolteil die Farbreaktion wesentlich beeinflussen, trifft nicht immer zu. Auch die 4-Alkylderivate, die ja auch in Lichtabsorption und Fluoreszenz eine Ausnahmestellung einnehmen, liefern blauviolette Farbtöne.

Strychnin und Vomicin

Über Strychnos-Alkaloide XXXII

Von *Heinrich Wieland, Rolf Huisgen* und *Robert Bubenik*

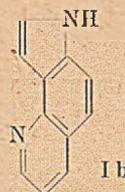
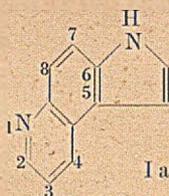
Mit 2 Figuren im Text

(Aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften zu München)

[Eingelaufen am 19. Januar 1948]

Die nahen Beziehungen zwischen Strychnin und Vomicin kommen in dem übereinstimmenden Ergebnis des oxydativen Abbaus der beiden Alkaloide zum Ausdruck. Durch diesen Abbau hat H. Leuchs¹⁾ das Strychnin $C_{21}H_{22}O_2N_2$ in eine Base $C_{15}H_{22}ON_2$, das sogenannte *Aponucidin* übergeführt, während man aus Vomicin, $C_{22}H_{24}O_4N_2$ auf dem gleichen Weg eine Base $C_{16}H_{24}O_2N_2$ erhalten hat²⁾. Der Unterschied in den Strukturelementen, C, H₂, O ist in diesen beiden Abbaubasen der gleiche wie in den Alkaloiden selbst, wenn man berücksichtigt, daß das eine der im Vomicin überzähligen O-Atome an einem aromatischen Ring haftet, der bei der Oxydation zerstört wird.

Die Base $C_{16}H_{24}O_2N_2$ wurde mit Palladium zu einer aromatischen Base $C_{15}H_{16}N_2$, dem *Vomipyridin* dehydriert, dessen Konstitution zwar im einzelnen noch unbekannt ist, das sich aber ziemlich sicher von einem Pyrrochinolin ableitet. Die Grundform Ia, die wir zuerst diskutierten³⁾, hat durch synthetische Versuche keine Stütze erhalten⁴⁾, sie verträgt sich auch nicht mit der neuesten Entwicklung der Strychninchemie und wird deshalb durch den isomeren Typ Ib ersetzt.



Der Umstand, daß der Unterschied in der Zusammensetzung der beiden Alkaloide in den beiden Abbaubasen praktisch erhalten geblieben ist, schien auf ihre gleichartige Struktur zu deuten und ließ bei der Dehydrierung des Aponucidins ebenfalls das Auftreten von Vomipyridin erwarten. Diese Erwartung bestätigte sich aber nicht. Die Base, die

¹⁾ H. Leuchs und H. Schulte-Overberg, B. **64**, 1007 (1931).

²⁾ H. Wieland und L. Horner, A. **528**, 73 (1937).

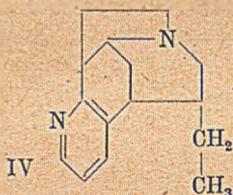
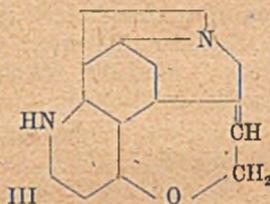
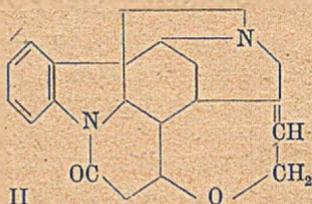
³⁾ a. a. O. S. 83.

⁴⁾ H. Wieland und L. Horner, A. **536**, 89 (1938); L. Horner, A. **540**, 73 (1939); R. Huisgen, A. **559**, 174 (1948).

isoliert wurde, $C_{15}H_{20}N_2$ entsprach schon mit ihrem hohen Wasserstoffgehalt nicht einem aromatischen Tricyclus und war auch in ihren Eigenschaften vom Vomipyrin grundverschieden. Auch in den nicht kristallisierbaren Anteilen der Reaktionsprodukte aus der Dehydrierung fand sich keine Andeutung für das Vorhandensein einer aromatischen Base von der Art eines Pyrrochinolins, die durch die intensive Gelbfärbung ihrer Salze leicht erkennbar gewesen wäre.

Damit wird offenbar, daß Strychnin und Vomiein in dem Molekelteil, den der oxydative Abbau hinterlassen hat, nicht die gleiche Struktur besitzen.

Die in jüngster Zeit durch die Arbeiten von Prelog⁵⁾, Robinson⁶⁾ und Woodward⁷⁾ erzielten Fortschritte in der Frage der Konstitution des Strychnins haben für dieses vielumstrittene Alkaloid in dem Strukturbild II durch R. Robinson die wohl endgültige Lösung gebracht. Für Aponucidin leitet sich aus II die Formel III ab. Sie macht ver-



ständig, daß aus Aponucidin kein aromatisches Dehydrierungsprodukt erhalten wird und wohl nur der Ring mit dem Stickstoff an der Wasserstoffabgabe beteiligt ist. Die Dehydrobase wäre demnach gemäß IV zu formulieren. Die Analysen von Dehydroaponucidin schließen aber eine Zusammensetzung $C_{14}H_{18}N_2$ nicht ganz aus, die den Verlust eines C-Atoms bei der Dehydrierung andeuten würde. Eine solche Möglichkeit wird im folgenden Kapitel erörtert.

Die Aromatisierbarkeit des Grundgerüsts im Falle der Abbaubase aus Vomiein läßt auf die Labilität, bzw. Spaltungsneigung eines der beiden Ringe, die N(b) als Glied enthalten, schließen.

⁵⁾ V. Prelog und S. Szpilfogel, *Experientia* 1, 197 (1945); *Helv.* 28, 1669 (1945).

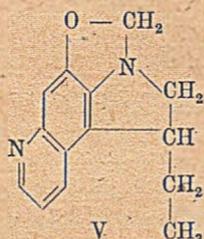
⁶⁾ *Experientia* 2, 1 (1946); *Nature* 157, 438 (1946); L. H. Briggs, H. T. Openshaw und R. Robinson, *Soc.* 1946, 903.

⁷⁾ R. B. Woodward, W. I. Brehm und A. L. Nelson, *Am. Chem. Soc.* 69, 2250 (1947).

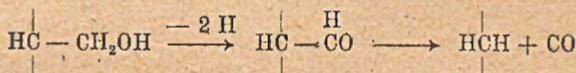
Zur Bildung und Konstitution des Vomipyrrins

Es wurde schon erwähnt, daß wir die anfangs für Vomipyrrin in Betracht gezogene Formel als unrichtig erkannt haben⁸⁾; es hat sich nämlich eine Methylimid-Gruppe in der Base feststellen lassen.

Die Dehydrierungsreaktion, die zum Vomipyrrin $C_{15}H_{16}N_2$ führt, überschreitet ein Zwischenprodukt $C_{16}H_{18}ON_2$, das isoliert wurde⁹⁾ und das unter Verlust der Bestandteile C, O und 2H bei erneuter Dehydrierung unter etwas schärferen Bedingungen in Vomipyrrin umgewandelt wird. Die frühere Formulierung für dieses Zwischenprodukt (V)

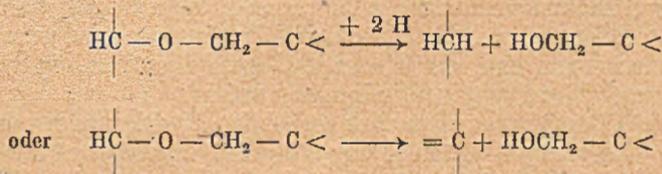


hat diese Beziehungen verständlich gemacht. Nachdem aber jetzt eine Methylgruppe am Indol-Stickstoff nachgewiesen ist, und da die Base C_{16} gleich dem Vomipyrrin vollkommen aromatischen Charakter hat, muß für den Verlust eines C-Atoms beim Übergang von $C_{16}H_{18}ON_2$ in $C_{15}H_{16}N_2$ eine andere Deutung gesucht werden. Wir nehmen an, daß in der sauerstoffhaltigen Base eine primäre Alkoholgruppe enthalten ist, die unter Abspaltung von 2H und CO abgebaut werden könnte:



Da diese Reaktion sich in der Seitenkette abspielt, muß auch die Vorstufe schon über das vollaromatische Grundgerüst des Vomipyrrins verfügen. Der Vergleich der UV-Absorptionsspektren, für deren Aufnahme wir Fr. Dr. F. Pruckner Dank schulden (Fig. 1), der Indol-Farbreaktionen und der Basizität rechtfertigen diese Auffassung. Entsprechendes gilt für das Paar $C_{16}H_{18}O_2N_2$ - und *Oxy-vomipyrrin*⁸⁾ (Fig. 2); im Schwefeldehydierungsprodukt $C_{16}H_{18}O_2N_2$ gelang durch Acetylierung der Nachweis des Hydroxyls.

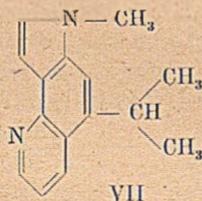
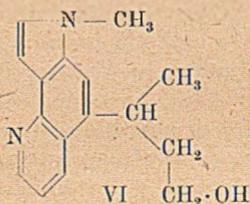
Die primäre OH-Gruppe ist, wenn diese Vorstellung zutrifft, durch Aufspaltung von einem der beiden Oxidringe entstanden, die wir im Vomycin bisher angenommen haben.



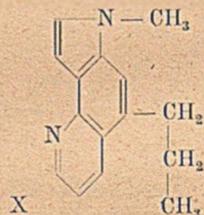
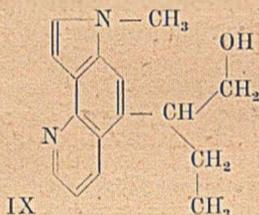
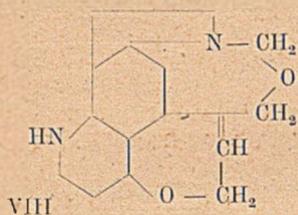
⁸⁾ H. Wieland und R. Huisgen, A. 556, 162 (1944).

⁹⁾ H. Wieland und L. Horner A. 545, 114 (1940).

Handelt es sich dabei um den Oxidoring a, den das Vomycin mit dem Strychnin gemeinsam hat und dessen Öffnung bereits beim Übergang der Alkaloide in ihre Iso-Basen zum Ausdruck kommt, so hat man der Vorstufe des Vomipyryns die Formel VI und diesem selbst VII zu geben. Vomipyryrin erscheint so als *5-Isopropyl-N-methyl-7(N),8-pyrrochinolin*.



Die zweite Oxidobrücke, die wir in die Molekel des Vomycins legen, kann bei der Ableitung des Vomipyryns vom 7(N)-8-Pyrrochinolin nicht mehr wie bisher den Stickstoff b mit einem der inneren Ringe verbinden. Wir fügen sie jetzt in den heterocyclischen Ring ein, so wie dies die Formel VIII für die Base $C_{16}H_{24}O_2N_2$ ausdrückt. Die Entstehung von



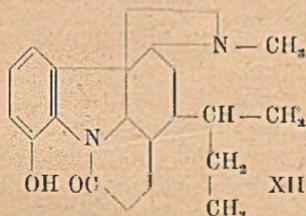
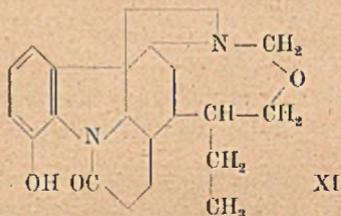
Vomipyryrin aus der Base gemäß VIII bedarf keiner näheren Erörterung. Nur muß man berücksichtigen, daß auch wenn die Formel VIII richtig ist, außer dem oben formulierten Reaktionsverlauf noch ein zweiter möglich ist, der zu einem mit VII isomeren Vomipyryrin führt. Das Zwischenprodukt kann nämlich auch die Konstitution IX haben, in dem die Oxidobrücke b durch Hydrierung geöffnet worden wäre. Das so entstandene Vomipyryrin wäre *5-n-Propyl-N-methyl-7(N),8-pyrrochinolin(X)*.

Eine C-Methylbestimmung nach Kuhn und Roth hat für Vomipyryrin 60 % von einem bei der Oxydation entstehenden Mol Essigsäure ergeben. Dieser Befund scheint mehr für eine n-Propyl- als für eine Isopropyl-Gruppe zu sprechen. Aber eine definitive Aussage wird man erst machen können, wenn eine vergleichende C-Methylbestimmung zweier isomerer aromatischer Propylverbindungen vorliegt.

Die C-Methylbestimmung hat auch für einige Hydrierungsprodukte aus Vomycin eine wertvolle Bestätigung erbracht. So entstand aus Vomycin selbst keine Essigsäure, aus Tetrahydro-desoxyvomycin (XI)¹⁰⁾

¹⁰⁾ A. 555, 23 (1943).

die 0,5 Mol entsprechende Menge. In der Base $C_{22}H_{30}O_2N_2$ aus Desoxyvomycin¹¹⁾, in der auch der Oxidoring b hydrierend geöffnet ist (XII), wurde 1,3 Mol Essigsäure als Produkt der Oxydation gefunden. Dies erscheint uns besonders bemerkenswert.



Wir wollen nicht verschweigen, daß die Formel für Vomycin, zu der wir durch die neuen Aufschlüsse über die Natur des Vomipyrins hingedrängt werden, zwar alle bisher bekannt gewordenen Umsetzungen des Alkaloids, soweit wir sehen, befriedigend erklärt, daß sie aber den beiden Stufen des Emde-Abbaus vom quartären Vomyciniumsalz aus¹²⁾ nach den Regeln der bisherigen Erfahrungen nicht gerecht wird.

Versuche

Dehydro-aponucidin

Das *Dioxonucidin* wurde nach den Angaben von Leuchs aus Brucidin dargestellt. Dessen Oxydation zu Carboxy-aponucidin wurde dahin abgeändert, daß die Isolierung der Substanz über das Perchlorat vermieden wurde.

6 g Dioxonucidin, in 120 cem Wasser gelöst, werden bei Raumtemperatur mit 26,8 cem 2,9proc. Wasserstoffperoxyd zusammengebracht. Die Temperatur steigt nach kurzer Zeit auf 28° und nach halbstündigem Stehen ist noch H_2O_2 nachzuweisen. Man leitet nun Schwefeldioxyd ein und erwärmt die Lösung bis zum Siedepunkt. Dann fällt man die gebildete Schwefelsäure genau mit Barytwasser aus und engt das Filtrat vom Bariumsulfat i. V. bis auf ein kleines Volumen ein. Nach mehrstündigem Stehen kristallisiert die Amino-säure in einer Ausbeute von 3,8 g (65% der Theorie) aus.

Zur *Dehydrierung* wurden 0,5 g Carboxy-aponucidin mit 0,7 g Palladiumschwarz innig vermischt und in einer Retorte im Metallbad im Verlauf von 6 Stunden auf 290° erhitzt. In der Vorlage sammeln sich geringe Mengen eines hellgelben Öls. Der Inhalt der Retorte wird im Hochvakuum, überdestilliert. Man nimmt das Destillat in Chloroform auf, schüttelt die Chloroformlösung mit wenig verdünnter Salzsäure aus, setzt die Basen aus der wäßrigen Lösung mit Ammoniak in Freiheit, schüttelt sie in Chloroform und wiederholt nach dem Abdampfen des Lösungsmittels die Destillation im Hochvakuum. Das Destillat wurde in wenig Methylalkohol aufgenommen. Dazu fügte man einige Tropfen

¹¹⁾ A. 469, 196 (1929). A. 527, 152 (1937).

¹²⁾ A. 545, 59 (1940); A. 555, 1 (1943).

ätherischer Salzsäure und brachte durch vorsichtigen Ätherzusatz das Chlorhydrat des *Dehydro-aponucidins* zur kristallinischen Abscheidung. Es beginnt bei 240° sich zu zersetzen.

Zur Analyse wurde das Salz im Hochvakuum getrocknet.

3,261 mg Subst.: 7,099 mg CO₂, 1,934 mg H₂O; 3,805 mg Subst.: 0,320 ccm N₂ (20°, 717 mm).

C₁₅H₂₀N₂ · 2 HCl (301,2) Ber. C 59,76 H 7,36 N 9,30
Gef. „ 59,41 „ 6,64 „ 9,58.

Eine Verbesserung der Ausbeute läßt sich erreichen, wenn man das Carboxy-aponucidin, das erst bei 289° schmilzt, im Gemisch mit Anthracen der Dehydrierung unterwirft.

1 g Carboxy-aponucidin, 1 g Anthracen und 1,5 g Palladiumschwarz wurden im Verlauf von 6 Stunden auf 260° erhitzt; von 200° ab wird die Temperatur langsam gesteigert. Die Aufarbeitung erfolgt wie vorher beschrieben. Bei der Hochvakuumdestillation gingen bei 100° (Bad) 140 mg über, aus denen wieder das Chlorhydrat gewonnen wurde. Es folgten noch weitere Fraktionen basischer Anteile, im ganzen 46 mg, aus denen keine einheitliche Substanz abgetrennt werden konnte. Das Auftreten gelber Salze wurde nicht beobachtet.

Die freie Base wurde aus der wäßrigen Lösung ihres Chlorhydrats mit Ammoniak ausgeschieden, in Chloroform aufgenommen und nach Entfernung des Lösungsmittels aus ihrer Petrolätherlösung durch langsames Eindunsten in schönen, farblosen Kristallen vom Schmp. 94° erhalten. Die Base ist hygroskopisch.

Zur Analyse wurde im Hochvakuum über P₂O₅ bis zur Konstanz getrocknet. 2,143 mg Subst.: 6,170 mg CO₂, 1,708 mg H₂O; 1,973 mg Subst.: 0,214 ccm N₂ (18°, 750 mm).

C₁₅H₂₀N₂ (228,2) Ber. C 78,88 H 8,83 N 12,27
C₁₄H₁₈N₂ (214,2) „ „ 78,45 „ 8,46 „ 13,09
Gef. C 78,52 H 8,92 N 12,56.

Die Base gibt mit dem Hopkins-Cole-Reagens keine Färbung und löst sich farblos in Säuren.

Methylimid-Bestimmungen

Die gewichtsanalytische Mikro-Methylimid-Bestimmung liefert für Vomipyrin und seine Derivate regelmäßig etwas zu tiefe Werte. Diese Beobachtung ist auch bei den synthetischen Pyrrochinolinbasen mit N-Methyl gemacht worden¹³⁾.

Vomipyrin: 3,866 mg Subst., 3,354 mg AgJ
4,351 mg Subst., 3,441 mg AgJ

C₁₅H₁₆N₂ (224,2) NCH₃ Ber. 12,9 Gef. 10,7 und 9,75

Oxy-vomipyrin: 3,886 mg Subst., 3,540 mg AgJ

C₁₅H₁₆ON₂ (240,2) NCH₃ Ber. 12,08 Gef. 11,26

Produkt der Dehydrierung mit Schwefel: 3,295 mg Subst., 2,591 mg AgJ.

C₁H₁₆O₂N₂ (270,2) NCH₃ Ber. 10,75 Gef. 9,75

Base C₁₆H₁₈ON₂ nach A. 545, 118 (1940):

C₁₆H₁₈ON₂ · HCl (290,5) NCH₃ Ber. 9,27 Gef. 8,38.

¹³⁾ R. Huisgen, A. 559, 101 (1948).

Die Zwischenprodukte der Dehydrierung

Die Base $C_{16}H_{18}ON_2$ konnte bei der Dehydrierung der Base $C_{16}H_{24}O_2N_2$ mit Palladium unter milden Bedingungen isoliert werden⁹⁾. Diese Vorstufe des Vomipyrins bildet gleich diesem, wie schon früher beschrieben, ein gelbes Monochlorhydrat, verfügt also, anders als Dehydro-aponocidin und im Gegensatz zu den früheren Formulierungen nur über *einen* basischen Stickstoff. Die Farbreaktion nach Hopkins-Cole ist rötlich, entspricht auch bei reinsten Präparaten in Art und Intensität der des Vomipyrins. Die hellblaue UV-Fluoreszenz hat die Base mit allen Pyrochinolinen gemein.

Der Körper $C_{16}H_{18}O_2N_2$, der bei der Schwefel-Dehydrierung der Base $C_{16}H_{26}O_2N_2$ entsteht⁸⁾, verhält sich zum Oxyvomipyrin wie die eben erwähnte Base $C_{16}H_{18}ON_2$ zum Vomipyrin. Die Hopkins-Cole-Reaktion liefert eine Schichtenfolge lilarot-gelbgrün, die von der des Oxyvomipyrins nicht unterscheidbar ist. Der Körper löst sich zwar als Carbostyryl-Derivat in verd. Salzsäure, gibt jedoch schon beim Eindampfen auf dem Wasserbad oder beim scharfen Trocknen im Exsiccator den Chlorwasserstoff wieder ab. Das zweite Stickstoffatom ist also nicht basisch, liegt, wie die Farbreaktionen zeigen, in einem Indol-system vor.

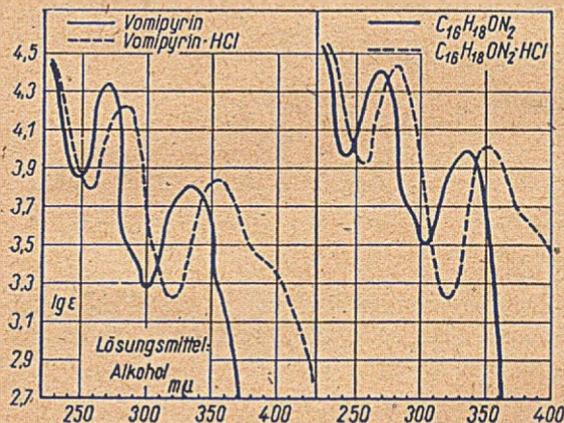


Fig. 1

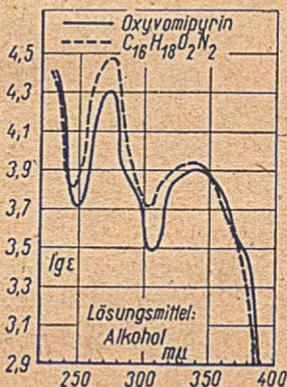


Fig. 2

Wie die Fig. 1 und 2 zeigen, stimmen in der Lichtabsorption die Zwischenprodukte mit den Endprodukten der Dehydrierung überein. In folgender Tabelle ist die Lage der Absorptionsmaxima in $m\mu$ angegeben.

		λ_{\max} I	λ_{\max} II
Vomipyrin:	Base.	270	333
	Chlorhydrat	284	356
C ₁₆ H ₁₈ ON ₂ :	Base.	270	336
	Chlorhydrat	282	350
Oxyvomipyrin	272	337
C ₁₆ H ₁₈ O ₂ N ₂	274	338

Acetylierung von C₁₆H₁₈O₂N₂(Produkt der Schwefeldehydrierung der Base C₁₆H₂₆O₂N₂)

In Kontrollversuchen mit Carbostyryl und Oxy-vomipyrin wurde zunächst die Resistenz der α -Oxychinolin-Gruppierung gegen Acetanhydrid festgestellt.

40 mg der Vorstufe von Oxyvomipyrin werden mit 0,5 ccm Essigsäureanhydrid 10 Minuten zum gelinden Sieden erhitzt. Der Überschuß an Acetanhydrid wird i. V. bei 50° (Bad) abgedampft. Der lackartige Rückstand wird beim Durchreiben mit Wasser körnig. Nach dem Trocknen wird aus sehr wenig Methanol umkristallisiert zu bläulosa gefärbten glänzenden Blättchen. Die Kristalle sind nach mehrfachem Umlösen aus ganz wenig Methanol unter Zusatz von Tierkohle zwar farblos, können aber von einer kleinen Menge amorpher Substanz erst durch schnelles Zentrifugieren der übersättigten Lösung befreit werden. Schmp. 148°.

Zur Analyse wurde bei 100° i. V. getrocknet:

1,681 mg Subst.: 4,256 mg CO₂, 1,083 mg H₂O

C₁₈H₂₀O₃N₂ (312,18) Ber. C 69,19 H 6,46
Gef. „ 69,05 „ 7,21.

Optische Drehung des Körpers C₁₆H₁₈O₂N₂

1. 13,1 mg Subst. in 5 ccm Methanol; 2 dm-Rohr; $\alpha_D^{20} = +0,13^\circ$; $[\alpha]_D^{20} = +24,8^\circ$.

2. 1,98 mg Subst. in 0,385 ccm 96proz. Alkohol; 1 dm-Rohr; $\alpha_D^{20} = +0,14^\circ$;
 $[\alpha]_D^{20} = +27,2^\circ$.

Wegen der Kleinheit der abgelesenen Drehung ist der Fehler mit 20 % zu veranschlagen. Außer Zweifel steht dagegen das Vorhandensein einer positiven Drehung.

C-Methyl-Bestimmungen in der Vomieinreihe

Für die C-Methyl-Analyse nach dem Kuhn-L'Orsa-Rothschen Verfahren wurden allerreinste Präparate verwendet. C-Methylhaltige Lösungsmittel wurden zum Umkristallisieren vermieden. Die Präparate wurden im Hochvakuum bei 100° getrocknet oder im Hochvakuum sublimiert. Für die Ausführung der Analysen sind wir dem KWI für medizinische Forschung in Heidelberg zu großem Dank verpflichtet. Als Testsubstanz wurde *Eserin* verwendet.

	mg Substanz	cem n/100 NaOH	% von 1 Mol Essigsäure
<i>Strychnin</i>	13,759	0	0
<i>Eserin</i>	17,670	2,42	37,7
	21,600	3,04	38,7
<i>Vomicin</i>	16,665	0	0
Base C ₁₆ H ₂₄ O ₂ N ₂ aus Vomicidin	16,055	0	0
<i>Tetrahydrodesoxyvomicin A</i>	9,275	1,25	50
	10,768	1,31	45
Base C ₂₂ H ₃₀ O ₂ N ₂ (Hydrierung von Desoxyvomicin)	10,360	3,75	128
	8,918	3,30	131
Base C ₁₆ H ₂₆ O ₂ N ₂ aus Vomicin	9,854	2,40	68
	9,947	2,24	63
<i>Dimethylvomicin</i>	10,484	0,61	24
	11,290	0,70	26
<i>Vomipyridin</i>	12,420	3,40	61,5
	6,803	1,84	60,7

Zur Kenntnis der sog. Glucose-oxydase

IV. Beziehungen zwischen enzymatischer und antibakterieller Wirkung.

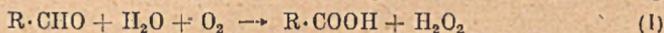
Von Jakob Freimann und Wilhelm Franke

Mit 7 Figuren im Text

(Mitteilung aus dem Institut für organisch-chemische Technologie und Gärungschemie der Universität Würzburg)

[Eingelaufen am 22. Januar 1947]

Die Glucose-oxydase, worunter bekanntlich das zuerst von D. Müller¹⁾ in Schimmelpilzen aufgefundene und von W. Franke und M. Deffner²⁾ als Flavoprotein erkannte Ferment der aeroben Glucose-säurebildung aus Glucose verstanden wird, hat in den letzten Jahren im Zusammenhang mit der Isolierung antibakteriell wirksamer Flavin-Eiweißkörper aus *Pen. notatum* (*Penatin*, *Notatin*, *Penicillin B*) aktuelles Interesse gefunden. Es wurde z. T. Identität, z. T. wenigstens nahe Verwandtschaft dieser Wirkstoffe mit dem Enzym angenommen, wobei die von Franke und Lorenz^{2a)} zuerst nachgewiesene H₂O₂-Bildung



die eigentliche Ursache der antibakteriellen Wirkung sein sollte. In der vorausgehenden III. Mitteilung dieser Serie war von Franke³⁾ anhangs-

¹⁾ Biochem. Z. 199, 136 (1928); Zusammenfassung der älteren Müllerschen Arbeiten in Erg. Enzymforsch. 5, 269 (1936).

²⁾ Ann. 541, 117 (1939).

^{2a)} Ann. 532, 1 (1937).

³⁾ Ann. 555, 111 (1944).

weise darauf hingewiesen worden, daß auch die in früher beschriebener Weise²⁾⁴⁾ aus *Asp. niger* und *Pen. glaucum* dargestellten Enzympräparate bakteriostatisch gegen *Staph. aureus* wirksam waren.

Über die Isolierung hochmolekularer „Mycoine“⁵⁾ von bakteriostatischer Wirkung haben bisher — von kurzen Mitteilungen W. Kocholatys^{6a)} über eine Substanz *Penatin* in Kulturfiltraten von *Pen. notatum* abgesehen — vor allem der englische Arbeitskreis um H. Raistrick⁶⁾ und der amerikanische um E. A. Doisy⁷⁾ nähere Angaben gemacht, der erstere nur in kurzer vorläufiger Form, der letztere in Form zweier systematischer Untersuchungen. Zu erwähnen ist ferner eine französische Arbeit von H. Pénaud, C. Levaditi und G. Hagemann⁸⁾ über einen offenbar identischen hochmolekularen Wirkstoff aus *Pen. corylophyllum*. Sämtliche Angaben beziehen sich auf die Aufarbeitung von Kulturfiltraten der Schimmelpilze, während von Franke³⁾ das *Mycel* aufgearbeitet und daraus hergestellte Präparate untersucht worden waren.

Versuche, enzymatische und bakteriostatische Aktivität gereinigter Präparate in exakte Beziehung zueinander zu setzen, fehlen bisher noch fast vollständig. In der vorausgehenden Mitteilung³⁾ war allerdings in orientierenden Versuchen an zwei Enzympräparaten mit den Q_{O_2} -Werten 220 und 450 ein annäherndes Parallelgehen der bakteriostatischen Wirksamkeit zum Q_{O_2} -Wert beobachtet worden. Doisy und Mitarbeiter^{7a)} haben statt der Geschwindigkeit der O_2 -Aufnahme die Zeit der anaeroben Methylenblaufärbung in Glucosegegenwart als Enzymtest heranzuziehen versucht. „Vorläufige Versuche, diese Reaktion als Ersatz für die bakterielle Prüfung von Penicillin B zu verwerten, sind nicht eindeutig gewesen.“ Dieses Ergebnis war allerdings nach fast gleichzeitigen Versuchen Frankes³⁾ — ihrerseits durch eine neuere Arbeit D. Müllers⁹⁾ angeregt —, wonach Farbstoffreduktion und aerobe Enzymwirkung keineswegs parallel laufen, vorauszusehen.

Die oben erwähnten angelsächsischen Autoren haben zur Anreicherung von *Notatin* bzw. *Penicillin B* eine Reihe von Verfahren angegeben, von denen einzelne, wie die *Aceton-* und *Ammonsulfatfraktionierung*, schon vor Jahren von Franke und Deffner²⁾ bei der Reinigung der Glucoscoxydase angewandt worden waren. Andere Methoden, wie die *Fällungen mit Tannin* und *Reineckesatz*⁶⁾, mit *Uranylacetat* und *Benzoessäure*⁷⁾ waren z. T. neu und am Enzym noch nicht erprobt. Im Zuge geplanter systematischer Untersuchungen über das Verhältnis von

⁴⁾ W. Franke bei Bamann-Myrbäck, D. Methodik d. Fermentforsch., S. 2386f. (Leipzig 1941).

⁵⁾ J. Vonkennel, J. Kimmig u. A. Lembke, Klin. Wschr. 22, 321 (1943).

^{6a)} J. Bact. 44, 142, 469 (1942).

⁶⁾ C. E. Coulthard, R. Michaelis, W. F. Short, G. Sykes, G. E. Skrimshire, A. F. B. Standfast, J. H. Birkinshaw u. H. Raistrick, Nature 150, 634 (1942). — J. H. Birkinshaw u. H. Raistrick, J. biol. Chem. 148, 459 (1943).

⁷⁾ E. C. Roberts, C. K. Cain, R. D. Muir, F. J. Reithel, W. L. Gaby, L. T. van Brüggén, D. M. Homan, P. A. Katzman, L. R. Jones u. E. A. Doisy, a) J. biol. Chem. 147, 47 (1943); b) J. biol. Chem. 148, 365 (1943).

⁸⁾ Bull. Soc. Chim. biol. 25, 406 (1943).

⁹⁾ Naturwiss. 28, 516 (1940); Enzymol. 10, 40 (1941).

enzymatischer und antibakterieller Wirkung schien es von Interesse, das Verhalten dieser Agenzien auch bei *Fermentreinigung*-versuchen zu prüfen. Versuche dieser Art stellen den Hauptinhalt des ersten Teils dieser Mitteilung dar. Im zweiten Teil wird dann über die antibakterielle Wirkung einiger auf verschiedene Weise dargestellter Enzympräparate berichtet. Obwohl abschließende Ergebnisse noch nicht erzielt werden konnten, sollen doch die bisherigen Befunde bekanntgegeben werden, da die Untersuchungen aus äußeren Gründen einstweilen unterbrochen werden müssen.

Methodik

1. Die enzymatischen Aktivitätsprüfungen erfolgten, soweit nicht anders angegeben, nach der Warburg-Methodik bei 30° in Luft (mit KOH auf Filterpapier im Mitteleinsatz der Gefäße). Der allgemeine Ansatz der Versuche — im folgenden stets als „Normalansatz“ bezeichnet — war:

- 1 ccm Enzymlösung (meist 1 mg Trockengewicht enthaltend)
- 2 „ m/5-Phosphatpuffer p_{H} 6,8
- 1 „ H_2O
- 1 „ m-Glucose (nach Temperatenausgleich zugekippt).

Schüttelgeschwindigkeit: 120 Hin- und Hergänge/Min.

Als *Aktivitätsmaß* diente zumeist der Ausdruck $Q_{\text{O}_2} = \frac{\text{cmm O}_2}{\text{mg Enzym} \times \text{Std}}$. Da die erhaltenen Q_{O_2} -Werte bei längerer Versuchsdauer aus verschiedenen Gründen (Enzymschädigung, pH-Änderung, Substrat- oder O_2 -Abnahme u. dgl.) stärker abfallen können, wurde der Einheitlichkeit halber, wo nichts weiteres vermerkt, Q_{O_2} grundsätzlich aus der O_2 -Aufnahme nach 10 Min. berechnet.

2. Die Prüfung der bakteriostatischen Wirkung geschah im wesentlichen wieder nach der in der vorausgehenden Mitteilung³⁾ näher beschriebenen Methode unter Verwendung des gleichen *Staph. aureus*-Stammes. Jedoch wurden die Verdünnungsreihen mit abgestuften Fermentzugaben nicht mehr in Glucosebouillon, sondern in einem einfacheren, in der II. Mitteilung von Doisy und Mitarb.^{7b)} angegebenen Nährmedium von der Zusammensetzung:

- | | | | |
|-------|--------------|---|---|
| 1 % | Witte-Pepton | } | mit verd. H_3PO_4 auf pH 6,0—6,5 gebracht |
| 1 % | Glucose | | |
| 0,5 % | NaCl | | |

durchgeführt. Feststellung der Wachstumsgrenze nach 24stündiger Inkubation bei 37°. Als *Maß der bakteriostatischen Wirkung* sei Q_{bact} , der Wert der das Bakterienwachstum gerade noch unterbindenden Verdünnung, eingeführt.

Versuche

I. Enzymwirkungen

A. Zur Kinetik

Zu Beginn der Untersuchung ergaben sich bei der Prüfung von Enzympräparaten sehr verschiedener Aktivität und Herkunft des öfteren Widersprüche, die z. T. offenbar auf die schon erwähnte Variabilität der Q_{O_2} -Werte, mangelnde Proportionalität zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Enzymkonzentration, unzureichende Konstanz der

Schüttelgeschwindigkeit und ähnliche Faktoren zurückgingen. Da die Kinetik der Glucoseoxydase, und zwar an ganz unreinen Präparaten ($Q_{O_2} = 15 - 45$), nur in der vor 10 Jahren erschienenen I. Mitteilung dieser Reihe^{2a}) etwas eingehender behandelt worden war, schien es im Interesse der Zuverlässigkeit der Aktivitätsangaben, auf die ja später die Angaben der bakteriostatischen Wirksamkeit bezogen werden sollten, ratsam, diesen Punkt an den nunmehr um Größenordnungen aktiveren Präparaten nochmals nachzuprüfen.

1. *Einfluß der Enzymkonzentration in Luft und O_2 .* Franke und Lorenz¹⁰) hatten bei Enzymmengen zwischen 2,5 und 50 mg ($Q_{O_2} = 24$) und O_2 -Aufnahmen von maximal 250 cmm/10 Min. in Luft Proportionalität zwischen Oxydationsgeschwindigkeit und Enzymkonzentration gefunden. Bei der neuerdings erfolgten Prüfung eines Präparates von $Q_{O_2} = 1100$ zeigte sich, daß in Luft die Proportionalitätsgrenze schon bei 1,5 mg (entsprechend einer O_2 -Aufnahme von 300 cmm/10 Min.) erreicht ist und daß bei 20 mg (entsprechend 860 cmm O_2 /10 Min.) die Geschwindigkeit der O_2 -Aufnahme von der Enzymmenge überhaupt unabhängig zu werden beginnt. (Fig. 1, Kurve I und Ia.) Daß es sich hier um eine *physikalisch* (durch die O_2 -Diffusion) bedingte Grenzgeschwindigkeit handelt, geht aus einem Parallelversuch in reinem O_2 hervor, in dem bei wenigstens aufs Doppelte gesteigerter Absolutgeschwindigkeit die Proportionalitätsgrenze auf ca. 3 mg erhöht und auch bei 30 mg Enzym noch keine Grenzgeschwindigkeit erreicht war (Fig. 1, Kurve II und IIa). In die gleiche Richtung weist der Einfluß

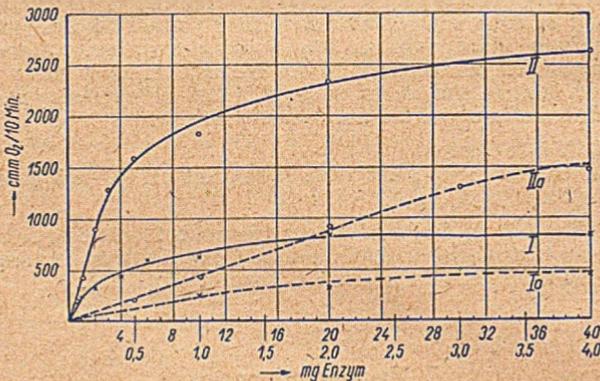


Fig. 1. Einfluß der Enzymkonzentration in Luft (I u. Ia) und Sauerstoff (II u. IIa).

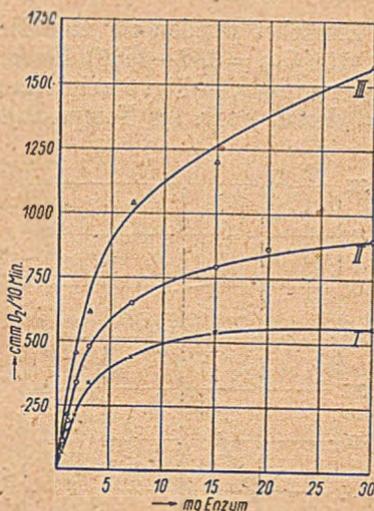
Normalansätze nach S. 201 (bis auf die variierte Enzymmenge). Kurve Ia und IIa mit 10fach vergrößertem Abszissenmaßstab.

der *Schüttelgeschwindigkeit*, der in drei Versuchsreihen mit 80, 120 und 160 Hin- und Hergängen/Min. untersucht wurde (Fig. 2). Erhöhung

Fig. 2.
Einfluß der Schüttelgeschwindigkeit.

Normalansätze.

I	80	Hin- und	Hergänge/Min.
II	120	„	„
III	160	„	„



der Schüttelgeschwindigkeit und damit der Lösungsgeschwindigkeit des Sauerstoffs wirkt qualitativ ähnlich wie Erhöhung des O_2 -Partialdrucks: die Grenze des Proportionalitätsgebiets rückt nach oben und die Grenzgeschwindigkeit der O_2 -Aufnahme wird bei zunehmend höheren Enzymkonzentrationen erreicht.

Für die Praxis der Aktivitätsbestimmung ergab sich aus diesen Versuchen, daß unter den üblichen Reaktionsbedingungen (Luft, 120 Schüttelbewegungen/Min.) eine O_2 -Aufnahme von etwa 300 cmm/10 Min. nicht überschritten werden sollte.

2. Der Einfluß der Temperatur auf Reaktionsgeschwindigkeit und Stabilität der Glucoseoxydase war ebenfalls in mehrfacher Hinsicht von Interesse. Bereits in der I. Mitteilung^{2a}) war an *Aspergillus*-Rohpräparaten ($Q_{O_2} = 24$) der für ein Enzym überraschend geringe Einfluß der Temperatur (im Bereich zwischen 20 und 37° in Luft) auf die Geschwindigkeit der O_2 -Aufnahme festgestellt¹⁰⁾ und auch eine (im wesentlichen wieder physikalische) Erklärung dafür zu geben versucht worden. Daß im untersuchten Temperaturbereich bereits eine Fermentschädigung bei dieser Erscheinung mitspielte, war bei der schon vorher von Müller¹⁾ angegebenen hohen Tötungstemperatur des *Aspergillus*-Enzyms (73°, bei späterer Nachprüfung Frankes³⁾ 63°) sehr unwahrscheinlich. Da bei gereinigtem *Penicillium*-Enzym aber niedrigere Tötungstemperaturen [56—58°³⁾] gefunden worden waren, schien eine Nachprüfung der Verhältnisse zweckmäßig, besonders auch im Hinblick auf die Tatsache, daß die Aktivitätsteste stets bei 30°, die bakterio-statischen Tests aber bei 37° ausgeführt wurden.

¹⁰⁾ Neuerdings von Doisy u. Mitarb.^{7b)} für Penicillin B bestätigt.

Zunächst wurden für eine Reihe von Enzymen verschiedener Aktivität ($Q_{O_2} = 186-4560$) Reaktionskurven bei 10° , 20° , 30° und 37° aufgenommen. — Fig. 3 zeigt eine typische Versuchsserie dieser Art — und daraus dann die Temperaturkoeffizienten berechnet (Tab. 1).

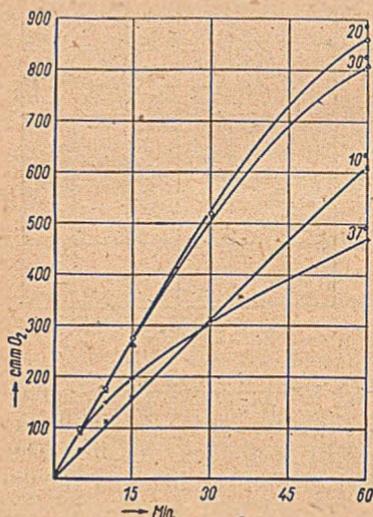


Fig. 3.
Einfluß der Temperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit.

Normalansätze.
Enzym mit $Q_{O_2} = 1050$.

In der ersten Vertikalspalte sind die Q_{O_2} -Werte der verwendeten Präparate (stets 1 mg im Ansatz) unter Normalbedingungen (S. 201), in der ersten Horizontalpalte die Versuchstemperaturen t und dazwischen die Temperaturkoeffizienten q (Q_{O_2}/Q_{O_2} , Q_{O_2}/Q_{O_2} und Q_{O_2}/Q_{O_2}) verzeichnet. Sämtliche Q_{O_2} -Werte aus den O_2 -Aufnahmen nach 10 Min. berechnet.

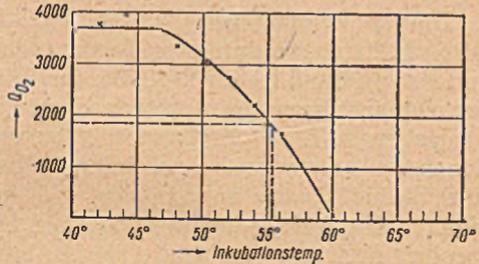
Tab. 1

Q_{O_2} \ u q t°	10°	q	20°	q	30°	q	37°
186	108	1,51	164	1,13	186	0,88	164
805	540	1,51	820	0,98	805	0,75	606
1050	684	1,55	1060	0,99	1050	0,72	890
1570	980	1,52	1490	1,06	1570	0,64	1000
3100	1950	1,49	2900	1,07	3100	0,64	1970
4560	2900	1,48	4300	1,06	4560	0,63	2880

Es zeigt sich, daß ein Optimum der Reaktionsgeschwindigkeit schon bei $20-30^\circ$ erreicht ist. Auffallend ist an Fig. 3 weiterhin das mit steigender Versuchstemperatur immer betonter auftretende Abfallen der Reaktionsgeschwindigkeit während des Versuchs.

In diesem Zusammenhang wurde nochmals die „Tötungstemperatur“ des *Penicillium*-Enzyms an einem hochaktiven Präparat ($Q_{O_2} = 3700$) durch halbstündiges Erwärmen des glucosfreien Ansatzes auf verschiedene Temperaturen bestimmt. Fig. 4 zeigt die nach dieser Vorbehandlung

Fig. 4. Einfluß der Temperatur auf die Stabilität der Glucoseoxydase (Bestimmung der „Tötungstemperatur“).



Normalansätze (zunächst ohne Glucose) 30 Min. auf verschiedenen Temperaturen gehalten, anschließend Glucosezusatz und Bestimmung der Restaktivität bei 30°.

im Normalversuch noch feststellbaren Q_{O_2} -Werte. Die „Tötungstemperatur“ liegt in Übereinstimmung mit früheren, an unreinerem *Penicillium*-Ferment ($Q_{O_2} = 120-540$) erhaltenen Ergebnissen bei 55°^{10a}). Aus dem Abfallen der Reaktionsgeschwindigkeit schon in bei ca. 20° tieferen Temperaturen ausgeführten Versuchen muß geschlossen werden, daß das „arbeitende“ Enzym erheblich temperaturempfindlicher ist als das „ruhende“. Es liegt nahe, an eine Enzymschädigung durch das intermediär entstehende *Hydroperoxyd* zu denken, wie sie ja besonders ausgeprägt beim Schardinger-Enzym der Milch beobachtet worden ist^{11, 11a}).

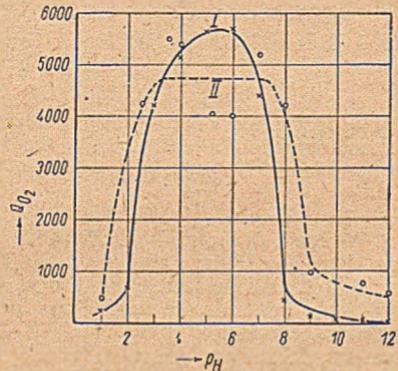
3. p_H -Abhängigkeit von Reaktionsgeschwindigkeit und Enzymstabilität sind in den Kurven I und II der Fig. 5 vergleichend zur Anschauung gebracht.

Fig. 5. p_H -Abhängigkeit von Reaktionsgeschwindigkeit (I) und Enzymstabilität (II).

- I direkte Aktivitätsbestimmung bei verschiedenem p_H .
 II Aktivitätsbestimmung bei p_H 6,8 nach vorausgehender 30 Min. langer Inkubation der Enzymlösung bei 20° und versch. p_H .

Pufferung:

- p_H 1— 2 m/10-Glykokoll-HCl
 p_H 3— 4 m/10-Citrat-HCl
 p_H 5— 7 m/15-Phosphat
 p_H 8— 9 m/10-Veronal-HCl
 p_H 10—12 m/10-Glykokoll-NaOH.



^{10a}) Nach Raistrick u. Mitarb.⁶⁾ wird Notatin bei 60° rasch zerstört.

¹¹⁾ M. Dixon, Biochem. J. 19, 506 (1925). — H. Wieland u. Mitarb., Ann. 477, 32 (1929); 483, 217 (1930).

^{11a)} Vgl. auch Fußnote ²¹⁾ S. 219.

Im ersteren Falle wurde unmittelbar die O_2 -Aufnahme durch 0,5 mg eines gereinigten Enzympräparates ($Q_{O_2} = 5000$) in Ansätzen von verschiedenem pH, im übrigen aber dem Normalansatz entsprechend, festgestellt, im letzteren erst, nachdem das Enzym zunächst 30 Min. bei 20° in den verschiedenen Pufferlösungen gehalten und anschließend Glucose zugegeben und pH 6,8 (durch Phosphatzusatz) eingestellt worden war.

Die fast symmetrische *Aktivitäts- p_H -Kurve I* entspricht im wesentlichen früheren, an unreinem Enzym erhobenen Befunden von Müller¹⁾ und Franke und Lorenz^{2a)}. Bei der *Stabilitäts- p_H -Kurve II*, die leider nur einmal aufgenommen werden konnte, läßt sich trotz der erheblichen, wenigstens z. T. auf Pufferspezifitäten und ungleiche Ionenkonzentrationen (s. unten) zurückgehenden Schwankungen immerhin deutlich eine Stabilitätszone zwischen p_H 2,5 und 8 feststellen^{11b)}. Jenseits dieser Grenzen läuft die Stabilitäts- der Aktivitätskurve im wesentlichen parallel, doch über der letzteren. Es scheint also, daß der Abfall der Aktivitätskurve bei extremen p_H -Werten durch irreversible Fermentschädigung bedingt ist¹²⁾, wobei die zuletzt erwähnte Differenz wieder durch die größere Empfindlichkeit des „arbeitenden“ Enzyms gegenüber dem „ruhenden“ erklärt werden könnte¹³⁾.

4. *Beeinflussung der Reaktionsgeschwindigkeit durch Phosphat- und Glykokoll-Zusatz* wurde bei Gelegenheit der Versuche des vorausgehenden Abschnitts beobachtet. Fig. 6 enthält das Ergebnis einiger Versuche mit jeweils 0,5 mg Enzym von

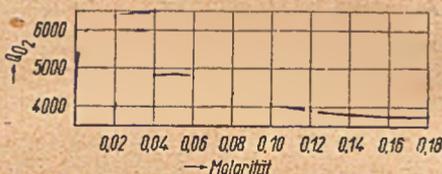


Fig. 6. Beeinflussung der Reaktionsgeschwindigkeit durch Phosphat- (I) und durch Glykokoll-Zusatz (II).

$Q_{O_2} = 4130$ unter Zugrundelegung des Normalansatzes bei p_H 6,8. Bemerkenswert ist insbesondere die aktivierende Wirkung des *Glykokolls*, die schon bei m/1000 30%, bei m/25 60% Steigerung gegenüber dem zusatzfreien Ansatz ausmacht.

^{11b)} Nach Raistrick u. Mitarb.⁶⁾ sowie Doisy u. Mitarb.⁷⁾ haben Notatin bzw. Penicillin B ganz ähnliche Stabilitätsgrenzen.

¹²⁾ Vgl. ähnliche Analysen mit dem Ergebnis reversibler und irreversibler Enzymschädigung bei extremen p_H -Werten an der *Tyraminase (Monoaminoxydase)* (M. L. C. Bernheim-Hare, *Biochem. J.* 22, 968; 1928) und an der *Oxaloxydase* (W. Franke, F. Schumann u. B. Banerjee, *Hoppe-Seylers Z.* 278, 24; 1943).

¹³⁾ Eine weniger wahrscheinliche, aber noch nicht ausgeschlossene Interpretation der Aktivitäts- p_H -Kurve als Dissoziationsrestkurve eines „Enzym-Ampholyten“ (vgl. z. B. R. Kuhn bei C. Oppenheimer, *Die Fermente u. ihre Wirkungen*, I, S. 197 ff., Leipzig 1925) müßte erst noch eingehender geprüft werden.

¹⁴⁾ Näheres s. III. Mitt.³⁾

B. Zur Enzymdarstellung und -reinigung

1. Grundoperationen

Zur Enzymgewinnung wurden drei *Penicillium*-Stämme verwendet, die sich bei der Prüfung von über 40 *Penicillium*- und *Aspergillus*-Stämmen verschiedener Herkunft¹⁴⁾ als die aktivsten erwiesen hatten. Es waren dies

Pen. glaucum 2 (Institut für Gärungsgewerbe, Berlin)

Pen. glaucum 312 (Fa. Knoll A.-G., Ludwigshafen)

Pen. notatum (Centralbureau voor Schimmelcultures, Baarn).

Irgendwelche grundsätzlichen Unterschiede im Verhalten von *Pen. glaucum* und von *Pen. notatum* wurden nicht beobachtet.

Aufgearbeitet wurde sowohl das *Mycel* als auch die *Kulturlösung*. Das in der letzten Mitteilung³⁾ angeführte Resultat, daß aus beiden ungefähr die gleiche Menge Enzym gewonnen werden kann (wobei das *Mycel*enzym aber im allgemeinen aktiver erhalten wird, vgl. Tab. 7, S. 211), wurde noch des öfteren bestätigt. Der Aufarbeitungsgang war in der Mehrzahl der Fälle der ebendort und an anderem Orte⁴⁾ eingehend beschriebene (Na₂HPO₄-Extraktion des zerkleinerten Mycels, Eindunsten der Extrakte bzw. Kulturlösungen i. V.; Dialyse und Alkohol-Ätherfällung).

Die *Aktivität* der so erhaltenen Rohpräparate lag mit recht erheblichen Schwankungen, deren Ursache zumeist nicht festgestellt werden konnte,

bei <i>Pen. glaucum</i> 2	zwischen	Q _{O₂} = 250	und	3500
„ <i>Pen. glaucum</i> 312	„	„ = 270	„	1070
„ <i>Pen. notatum</i>	„	„ = 220	„	740.

Trotz seltener Überimpfung der Stammkulturen (alle 1—2 Monate) lag das Aktivitätsniveau der in den späteren Phasen der Arbeit (1944/45) erhaltenen Präparate durchweg höher als am Anfang (1943/44).

Im allgemeinen wurden pro Charge 15—20 l Nährlösung (mit 4 % techn. Glucose) in 75—100 Petrischalen (Bodenfläche je ca. 500 qcm) bei 30° 4—6 Tage bebrütet; nach dieser Zeit wurden 350—700 g Preßmycel (mit einem Trockengewicht von ca. 37 %) geerntet, aus denen sich 1—6 Millionen *Enzymeinheiten* (E.E. = mg Enzympräparat × Q_{O₂}) isolieren ließen. Der Quotient *E.E./g Preßmycel* lag in einer größeren Reihe von Ansätzen

bei <i>Pen. glaucum</i> 2	zwischen	4000	und	20000
„ <i>Pen. glaucum</i> 312	„	2600	„	10000
„ <i>Pen. notatum</i>	„	1900	„	11000.

2. Weitere Anreicherungsverfahren

Neben den bereits in der Einleitung erwähnten Enzymreinigungsverfahren gelangte noch die *Adsorption an Aluminiumhydroxyd C₇* zur Anwendung. Nachstehend wird über die mit den verschiedenen Methoden erzielten Ergebnisse berichtet.

a) Die *Fraktionierung mit Aceton* wurde zur Reinigung von Rohpräparaten am häufigsten angewandt. Sie führt bei Präparaten geringen (Q_{O₂} < 200) und mittleren Reinheitsgrads (Q_{O₂} < 800) unter mäßigen Verlusten (20—35 %) in wenigen Stunden zu zwei- bis mehrfach angereicherten Trockenpräparaten.

Meist wurde das Ausgangsmaterial in der 20fachen Gewichtsmenge destill. Wassers gelöst, die Lösung zentrifugiert und im Kälteraum (3–5°) nacheinander mit dem 0,4-, 0,4- und 0,8fachen Volumen vorgekühlten Acetons (bezogen auf das Ausgangsvolumen) gefällt. Die abzentrifugierten Niederschläge wurden im Vakuumexsikkator möglichst rasch zur Trockene gebracht. Nachstehend folgt ein typisches Versuchsergebnis.

Tab. 2

	mg	Q _{O₂}	E.E.	%
Ausgangsmaterial	25000	330	8250000	100
Produkte:				
Rückstand	6420	104	667700	8,1
I. Fraktion	1282	195	250000	3,3
II. „	3350	1380	4623000	56,0
III. „	5830	93	542200	6,6
	10882		6082900	74,0

Bei noch aktiverem Ausgangsmaterial arbeitet das Verfahren weniger effektiv und wird verlustreich, wie das in Tab. 3 wiedergegebene Versuchsprotokoll zeigt. Q_{O₂}-Werte > 2000 ließen sich durch Acetonfraktionierung kaum erreichen.

Tab. 3

	mg	Q _{O₂}	E.E.	%
Ausgangsmaterial	500	1380	690000	100
Produkte:				
Rückstand	38	266	7450	1,1
I. Fraktion	25	1600	40000	5,8
II. „	232	1320	306000	45,5
III. „	37	110	4070	0,6
	332		357520	52,0

b) Die fraktionierte Ammonsulfatfällung war schon in der II. Mitt.²⁾ mit Erfolg zur Enzymreinigung herangezogen worden. Doisy und Mitarb.^{7b)} gaben später an, daß ihr Penicillin B bei Halbsättigung der Lösung mit (NH₄)₂SO₄ nicht, bei Dreiviertelsättigung fast vollständig ausgefällt würde. Unsere an der Glucoseoxydase neuerdings erhaltenen Ergebnisse waren nicht eindeutig und befriedigend. Von den nicht unerheblichen Fermentverlusten (30–45 %) ganz abgesehen, gelang es gerade bei vorgereinigtem Material (Q_{O₂} > 800) selbst bei Vollsättigung mit (NH₄)₂SO₄ nicht annähernd, eine vollständige Enzymabscheidung durchzuführen, vielmehr blieb der größere Teil des Enzyms in der Restlösung zurück. Dies belegt an einem Beispiel Tab. 4.

Tab. 4

2 g Enzym ($Q_{O_2} = 833$) gelöst in 40 ccm H_2O und zentrifugiert; in zwei Portionen festes $(NH_4)_2SO_4$ bis zu den Sättigungsgraden 66 und 100% zugegeben. Niederschläge abzentrifugiert und dialysiert.

	mg	Q_{O_2}	E.E.	%
Ausgangsmaterial	2000	833	1666000	100
Produkte:				
Rückstand	500	400	200000	12,0
I. Fraktion	77	1600	123000	7,4
II. „	60	1850	111000	6,7
Restlösung	1056	662	700000	42,0
	1693		1134000	68,1

Dieses Ergebnis steht in ungeklärtem Widerspruch zu einem *einzelnen* in der II. Mitt. zitierten Versuch an vorgereinigtem Ferment ($Q_{O_2} = 1215$); es ist jedoch wiederholt bestätigt worden. Günstiger scheinen die Fällungsverhältnisse für *rohes* Enzym zu liegen. So wurden bei Ausgangsmaterial von $Q_{O_2} = 50$ 28% mit ca. 10facher Anreicherung bei $(NH_4)_2SO_4$ -Sättigung abgeschieden, während in der Lösung 17% verblieben. Dieses Ergebnis steht der Richtung nach in annähernder Übereinstimmung mit einem gleichfalls in der II. Mitt. angegebenen Fällungsversuch an *Rohenzym* ($Q_{O_2} = 98$).

c) *Adsorption an Aluminiumhydroxyd C₇* erwies sich als ein Verfahren, das auch bei gereinigtem Ferment zu weiterer starker Anreicherung führt^{14a)}. Leider scheint das Enzym in den Eluat, nach der Kinetik zu schließen, ziemlich labil zu sein. Tab. 5 und 5a geben die Hauptdaten zweier Adsorptions- und Elutionsversuche.

Tab. 5

250 mg ($Q_{O_2} = 1080$) gelöst in 100 ccm m/10-Phosphatpuffer (p_H 5,2), zentrifugiert und mit 30 ccm einer $Al(OH)_3$ -Suspension von 0,95% Al_2O_3 -Gehalt versetzt. Adsorbat 3mal je 30 Min. mit 40 ccm m/10-Phosphatpuffer (p_H 7,9) eluiert.

	mg	Q_{O_2}	E.E.	%
Ausgangsmaterial	250	1080	270000	100
Produkte:				
Rückstand	17	230	3950	1,5
Restlösung	87,5	1000	87500	32,3
I. Elution	12,4	6500	80500	31,5
II. „ } des Ad-	8,4	1200	10200	3,8
III. „ } sorbats	10,4	310	3250	1,2
	135,7		185400	70,3

^{14a)} Versuche zur Adsorptionsreinigung (mit Al-oxyd nach Brockmann und Tricalciumphosphat) sind von Pénau, Levaditi u. Hagemann⁸⁾ unternommen worden, offenbar ohne Erfolg. Andererseits soll „ein vollkommen neues Fixierungsverfahren durch geeignete Adsorbentien“ kombiniert mit Acetonfällung bei -10° „ohne Verlust“ zu bakteriostatisch hochaktiven Präparaten führen.

Tab. 5a

Zur Lösung des Enzyms 100 ccm m/10-Acetatpuffer (pH 5,0), zur Elution 5ma. je 40 ccm m/10-Na-Acetatlösung (pH ca. 7,9) verwendet. Übrige Daten wie oben.

	mg	QO ₂	E.E.	%
Ausgangsmaterial	250	1080	270000	100
Produkte:				
Rückstand		nicht bestimmt		
Restlösung	76,8	193	14800	5,5
I. Elution	12,4	2700	34500	12,8
II. „	8,8	5000	44000	16,3
III. „	6,8	5050	34400	12,7
IV. „	6,4	5260	33500	12,4
V. „	7,4	3750	27600	10,2
	118,6		188800	69,9

Die Unterschiede im Ablauf von Adsorption und Elution in Abhängigkeit von Lösungsmittel und Eluens sind bemerkenswert; der Endeffekt der Enzymreinigung ist dabei trotzdem nicht sehr verschieden.

Es sei noch erwähnt, daß die vereinigten Eluate II—IV des letzten Versuchs bei Aufbewahrung im Eisschrank innerhalb von 2 Wochen $\frac{1}{5}$, innerhalb von 4 Wochen $\frac{1}{3}$ der Ausgangsaktivität (QO₂ 5100) verloren. Dagegen sank die Aktivität des „arbeitenden“ Enzyms im Normalversuch schon innerhalb einer Stunde in ähnlichem Umfang. (Vgl. S. 205 u. 206.)

d) Die Adsorptionsfällung mit Benzoesäure ist von Doisy und Mitarb.⁷⁾ für die direkte Aufarbeitung von Kulturlösungen auf Penicillin B angegeben worden. Wir haben die Methode, die mit der Acetonfällung den Vorteil, unmittelbar salzfreie Trockenpräparate zu liefern, gemeinsam hat, auch zur Fraktionierung vorgereinigten Enzyms angewandt. Über das Ergebnis unterrichtet Tab. 6.

Tab. 6

5 g Enzym (QO₂ = 222) in 100 ccm H₂O gelöst, zentrifugiert und bei 4° 3mal mit je 20 ccm gesättigter alkoholischer Benzoesäurelösung versetzt. Enzym-Benzoesäure-Adsorbate jeweils mit 30 ccm Aceton bei 4° zerlegt und Enzym abzentrifugiert.

	mg	QO ₂	E.E.	%
Ausgangsmaterial	5000	222	1110000	100
Produkte:				
Rückstand	810	124	100400	9,0
I. Fraktion	325	403	140000	12,8
II. „	325	470	153000	13,8
III. „	185	374	69200	6,3
	1645		462600	41,9

Das ersichtlich verlustreiche Verfahren zeigt keine Vorteile etwa gegenüber der Acetonfraktionierung und wurde daher in dieser Form nicht weiter angewandt. Wohl aber konnten wir die Angaben Doisy's über die Eignung der Methode zur Abscheidung des Ferments aus Kulturlösungen bestätigen. Sie erspart das zeitraubende und dauernd kontrollbedürftige Eindampfen der großen Flüssigkeitsvolumina i. V. und liefert in vergleichbarer Ausbeute (an Enzymeinheiten) fast stets ein reineres Enzym als das Eindampfverfahren, wie die Gegenüberstellung einiger Parallelaufarbeitungen in Tab. 7 zeigt.

Tab. 7

Eindampfverfahren wie früher [S. 207 und l. c.³⁾] beschrieben. Zur Benzoesäurefällung im Kälteraum auf 1 l Kulturlösung von p_H 3,5 50 ccm gesättigte alkoholische Benzoesäurelösung zusetzen, Fällung auf der Nutsche abfiltrieren, den noch feuchten Kristallkuchen mit der zur Lösung der Benzoesäure ausreichenden Menge kalten Acetons behandeln, Enzymrückstand abzentrifugieren, mit Aceton nachwaschen und i. V. trocknen.

Pilzstamm	QO ₂ des Mycel-enzym	l Kultur-lösung	QO ₂		E.E.	
			Eindampf-verfahren	Benzoe-säurefällg.	Eindampf-verfahren	Benzoe-säurefällg.
<i>Pen. glaucum</i> 2	366	6	114	428	312000	424000
" " 2	715	9	166	393	226000	120000
" " 2	619	8,5	522	542	517300	370000
" " 312	1250	9	715	437	391100	375800

e) Die Fällung mit Reinecke-Salz ($NH_4[Cr(NH_3)_2(CNS)_3]$) ist von Raistrick und Mitarb.⁶⁾ ohne nähere experimentelle Angaben zur Reinigung des Notatins empfohlen worden. Wir haben einige orientierende Versuche an Glucoseoxydase ausgeführt, in denen zwar erhebliche Anreicherungen, aber nur sehr schlechte Enzymausbeuten in der Fällung erzielt wurden (Tab. 8). Wir haben die Methode daher nicht weiter verfolgt.

Tab. 8

1 g Enzym (QO₂ = 520) in 20 ccm H₂O gelöst, zentrifugiert und mit 5 ccm kalt gesättigter Reinecke-Salzlösung (ca. 5proz.) versetzt. Niederschlag abzentrifugiert und mit 5 ccm Aceton zerlegt, in dem das Komplexsalz löslich ist. Rückstand zentrifugiert, mit Aceton gewaschen und i. V. getrocknet.

	mg	QO ₂	E.E.	%
Ausgangsmaterial	1000	520	520000	100
Produkte:				
Rückstand	46	222	10200	2,0
Fällung	27	1700	41700	8,0
	73		51900	10,0

f) *Fällung mit Uranylacetat.* Dieses Verfahren ist in der II. Mitt. von Doisy und Mitarb.^{7b)} als der Benzoesäurefällung von Penicillin B überlegen beschrieben worden. In der Tat lieferte es auch bei unseren Fermentreinigungsversuchen ausgezeichnete Resultate, und zwar auf vorgereinigtes Enzym sowohl wie auf Kulturlösungen angewandt. Bei den letzteren lassen allerdings in manchen Fällen die Ausbeuten zu wünschen übrig. In Tab. 9 folgen einige Angaben über den Verlauf einer Enzymreinigung.

Tab. 9

100 mg Enzym ($Q_{O_2} = 1200$) in 5 ccm H_2O gelöst, zentrifugiert und mit 2 ccm 1proz. Uranylacetat-Lösung bei p_H 3,5 gefällt. 2mal mit je 5 ccm H_2O gewaschene Fällung 2mal je 3 Std. mit 1 ccm m/5-Phosphatpuffer p_H 6,8 eluiert, Eluato vereinigt.

	mg	Q_{O_2}	E.E.	%
Ausgangsmaterial	100	1200	120000	100
Produkte:				
Rückstand	9,1	220	2000	1,5
Fällung	20,5	2260	47000	39,0
	29,6		49000	40,5

In einem anderen Versuch wurde 1 l Kulturlösung von *Pen. glaucum* 312 — das Mycelenzym hatte $Q_{O_2} = 1070$ gezeigt — mit 25 ccm 1proz. Uranylacetat-Lösung gefällt und wie oben weiterverarbeitet. In den Eluaten waren 41250 E.E. mit der erstaunlich hohen Aktivität $Q_{O_2} = 3750$ enthalten. In anderen Fällen wiederum lagen die Aktivitäten nur etwas höher als die der Benzoesäurefällungen.

g) *Die Tanninfällung,* von Raistrick und Mitarb.⁶⁾ ohne nähere Angaben als wirksam empfohlen, scheint nach unseren Erfahrungen der Uranfällung ungefähr gleichwertig zu sein, wie dies der Versuch der Tab. 10, in dem das gleiche Enzym wie im Versuch der Tab. 9 zur Anwendung kam, belegt.

Tab. 10

1 g Enzym ($Q_{O_2} = 1200$) in 25 ccm H_2O gelöst, zentrifugiert und mit 25proz. Tanninlösung bei p_H 3,5 in geringem Überschuß (Prüfung mit $FeCl_3$) gefällt. Niederschlag 2mal mit je 5 ccm Aceton digeriert, zentrifugiert und i. V. getrocknet.

	mg	Q_{O_2}	E.E.	%
Ausgangsmaterial	1000	1200	1200000	100
Produkte:				
Rückstand	52	235	12400	1,1
Fällung	285	2150	615000	51,3
	337		627400	52,4

Die Fällung von Kulturlösungen mit Tannin — wir verwendeten zwischen 0,25 und 0,50 g/l — scheint ein schlecht reproduzierbares Verfahren zu sein, bei dem manchmal starke Aktivitäts- und Enzymverluste auftreten. Wir geben in Tab. 11 zwei Beispiele mit mäßigem bzw. befriedigendem Erfolg.

Tab. 11

Pilzstamm	Q _{O₂} des Mycelenzym	1 Kulturlösung	mg Enzym	Q _{O₂}	E.E.
<i>Pen. glaucum</i> 2 .	3500	6	150	504	76000
<i>Pen. notatum</i> .	736	6	211	620	131000
(Zum Vergleich <i>Benzoessäurefällung</i> :					
	736	6	399	273	109000)

II. Antibakterielle Wirkungen

A. Testmethode

Nach den lediglich orientierenden Versuchen der III. Mitt. erschien es uns als wichtigste Aufgabe, zunächst die Bedingungen des Tests zu variieren und dann möglichst optimal zu gestalten. Zu diesem Zwecke haben wir den Einfluß einer Variation im p_H der Nährlösung, im Nährsubstrat selbst, in der Glucosekonzentration, in der Bebrütungsdauer und im Bakterienstamm auf die Wachstumsgrenze untersucht.

1. *Einfluß des p_H .* Im Hinblick auf das schwach saure Wirkungsoptimum der Glucoseoxydase lag es nahe, das p_H der Nährlösung ziemlich tief zu halten, wobei allerdings ein sicheres Angehen der Bakterienaussaat begrenzender Faktor war. Wir geben in Tab. 12 als Beispiel für das allgemeine Verfahren ein etwas ausführlicheres Protokoll.

Tab. 12

Nährlösung (S. 201) mit verd. H_3PO_4 auf die (elektrometrisch kontrollierten) p_H -Werte 5,5, 6,4 und 7,3 gebracht. Enzymlösung hergestellt durch Auflösen von 20 mg Enzympräparat ($Q_{O_2} = 2000$) in 10 ccm sterilem H_2O , 100faches Verdünnen¹⁵⁾ von 1 ccm dieser „Stammlösung“ mit sterilem H_2O und Filtrieren dieser Lösung durch ein bakteriendichtes Schott-Filter unter sterilen Bedingungen. Zugabe der Enzymlösung zur beimpften Nährlösung (5 ccm) mittels steriler Mikropipette. Nach 24 Std. bei 37° fehlende oder eingetretene Trübung der Nährlösung durch 0, +, ++ oder +++ bezeichnet.

p_H	ccm Enzymlösg./5 ccm	0,1	0,05	0,025	0,01	0
	mg Enzym/5 ccm	0,002	0,001	0,0005	0,00025	0
	Verdünnung 1:	2500000	5000000	10000000	25000000	∞
	5,5	0	++	++	++	++
	6,4	0	++	++	++	++
	7,3	0	++	++	++	++

¹⁵⁾ Der notwendige Verdünnungsgrad (10-, 100-, 1000fach) mußte jeweils in einem Vorversuch über die annähernde Wachstumsgrenze ausprobiert werden.

Ein Einfluß des p_{H} der Nährlösung war also im untersuchten Bereich nicht festzustellen. Bei den folgenden Versuchen wurde fast stets ein p_{H} zwischen 6,0 und 6,5 eingestellt.

2. *Einfluß des Nährsubstrats und der Glucosekonzentration.* Es wurden untersucht Nährbouillon (Standard Merck I), Peptonwasser (Pepton-Witte) und Hefewasser. Das letztere schied aus, da unsere *Staph. aureus*-Stämme darauf nicht oder nur unregelmäßig angingen. Bei den beiden erstgenannten Substraten wurde gleichzeitig auch die Glucosekonzentration variiert. Das Ergebnis zeigt die Doppeltab. 13.

Tab. 13

20 mg Enzym ($Q_{O_2} = 3000$) in 20 cem Stammlösung 10- bzw. 100fach verdünnt.

Verdünnung	1:	1000000	2000000	5000000	10000000	25000000	∞
Glucose konz. in %							

a) Peptonwasser

0	+	+	+	+	+	+
0,5	0	0	0	++	++	++
1,0			0	0	++	++
2,5			0	0	++	++
5,0			0	0	++	++

b) Nährbouillon

0	++	++	++	++	++	++
0,5	0	0	++	++	++	++
1,0			0	0	++	++
2,5			0	0	++	++
5,0			0	0	++	++

In einem Ergänzungsversuch wurde gezeigt, daß ohne Glucosezusatz in beiden Nährmedien auch bei einer Enzymverdünnung von 1: 100000 noch normales Wachstum eintrat.

Die Wachstumsgrenzen sind bei Peptonwasser und Nährbouillon praktisch dieselben. Wir entschieden uns bei weiteren Versuchen für das erstere Medium als das einfacher zusammengesetzte, zumal auf verschiedenen während des Kriegs gelieferten Präparaten von Merckscher Nährbouillon einige Staphylokokkenstämme nicht oder nur schwierig angingen.

3. *Der Einfluß der Bebrütungsdauer* geht dahin, daß sich bei ihrer Verlängerung im allgemeinen die Wachstumsgrenze nach geringeren Verdünnungen verlagert, allerdings in quantitativ nicht gut reproduzierbarer Weise. In Tab. 14 ist der Effekt für zwei verschiedene Enzympräparate (I $Q_{O_2} = 300$, II $Q_{O_2} = 1000$) zur Anschauung gebracht.

Tab. 14

Verdünnung Präparat	1:	200000	500000	1000000	2000000	5000000	∞
	a) nach 24 Stunden						
I	0	0	0	+	+	++	++
II	0	0	0	0	0	0	++
b) nach 56 Stunden							
I	0	0	0	++	++	++	++
II	0	0	0	0	++	++	++
c) nach 144 Stunden							
I	0	0	++	++	++	++	++
II	0	0	0	+	++	++	++

4. Der Einfluß des Bakterienstamms wurde an 4 verschiedenen Stämmen von *Staph. aureus* untersucht^{15a)}. Es ergab sich bei Verwendung eines Enzympräparates $Q_{O_2} = 3000$ für sämtliche Stämme Wachstumshemmung bei der Verdünnung 1:1000000. Bei Wiederholungsreihen schwankte dieser Wert höchstens zwischen 1:5 und 1:10 Millionen¹⁶⁾. Auf Grund dieses Ergebnisses wurde weiterhin immer der gleiche Staphylokokkenstamm (Knoll a) verwendet.

Über das Verhalten gramnegativer Bakterien wurden nur einige orientierende Versuche angestellt. Das obige Präparat war gegen *B. coli* in der Verdünnung 1500000, gegen *B. prodigiosum* bei 1:25000, gegen *B. Salmonella* bei 1:10000 noch nicht wirksam. Die geringere Empfindlichkeit der Gramnegativen haben auch Doisy u. Mitarb.^{7b)} beim Penicillin B festgestellt.

5. Weitere Bemerkungen zur Testmethode. Die Methode der Verdünnungsreihen ist zweifellos nicht sehr genau^{16a)}. Schwankungen der Wachstumsgrenze um 1 Teströhrchen müssen in Parallelversuchen ohne weiteres in Kauf genommen werden. Das bedeutet bei der ziemlich groben Verdünnungsskala Konzentrationsvariationen ums 2—2½fache. Durch mehrmalige Wiederholung des gleichen Versuchs läßt sich diese Unsicherheit verringern.

Eine weitere Fehlerquelle beim Vergleich enzymatischer und antibakterieller Wirkungen liegt in der Sterilfiltration der Enzymlösungen. Wir haben die Q_{O_2} -Werte im allgemeinen an zentrifugierten, nicht an

^{15a)} Drei dieser Stämme verdanken wir Herrn Dr. Biehler vom Pharmakolaboratorium der Fa. Knoll A.-G., Ludwigshafen, den vierten Herrn Doz. Dr. Reinhardt, Prag.

¹⁶⁾ Ein weiterer *Staph. aureus*-Stamm (Heidelberg) ergab überraschenderweise unter den gleichen Bedingungen eine Wachstumsgrenze bei 1:20000; bei der mikroskopischen Kontrolle zeigte er sich in geringem Maße durch Stäbchenbakterien verunreinigt. Wie hier, so wurde stets in Zweifelsfällen das Mikroskop zu Rate gezogen.

^{16a)} Vgl. die grundsätzlichen Ausführungen R. Prigges, Klin. Wschr. 19, 100 (1940).

filtrierten Lösungen bestimmt. Bei der Filtration kann sich sowohl das Trockengewicht als auch die enzymatische Aktivität ändern, wodurch sich die Bezugsbasis des Aktivitätsvergleichs verschiebt. Im allgemeinen sind nach unseren Erfahrungen diese Änderungen, zumal bei den meist verwendeten Alkohol-Äther- und Acetonfällungen, nicht groß.

So sank in drei Versuchen mit 6maligem Durchfiltrieren einer Enzymlösung vom Ausgangswert $Q_{O_2} = 3330$ durch je 3 Schott-Nutschen der Q_{O_2} -Wert (ohne Trockengewichtskontrolle) auf 2200, resp. 2450 und 2600.

In anderen Fällen aber (z. B. bei Tanninfällungen) scheinen diese Aktivitätsabnahmen erheblich zu sein. Ferner steigen sie im allgemeinen an bei mehrmaliger Verwendung der gleichen Nutsche zur Filtration, da wir zwecks Zeitersparnis und Schonung der Nutschen diese — nach Durchspülung mit destilliertem Wasser — mehrmals verwendeten und erst nach etwa 3maligem Gebrauch mit heißer konz. H_2SO_4 reinigten. Die Filtrationsgeschwindigkeit nimmt bei öfterer Verwendung der Nutschen gleichfalls erheblich ab.

Erst in einer späteren Phase der Untersuchung fanden wir, daß sich die sterilisierende Filtration umgehen läßt, indem man die Enzymlösungen 1—5 Std. unter öfterem Umschütteln mit *Chloroform* behandelt und dann von diesem abgießt. Bei Verwendung eines Präparats $Q_{O_2} = 2027$ fanden wir sowohl nach der Filtrations- wie nach der Chloroformmethode die gleiche Wachstumsgrenze bei einer Verdünnung von 5—10 Millionen. $CHCl_3$ -gesättigtes Wasser zeigte auch in 10facher Menge keinen Hemmungseffekt.

B. Versuchsergebnisse

1. Bakteriostatische Reihenversuche

Der größte Teil unserer bisherigen Versuche über die bakteriostatische Wirkung von Enzympräparaten ist in Fig. 7 zur Darstellung

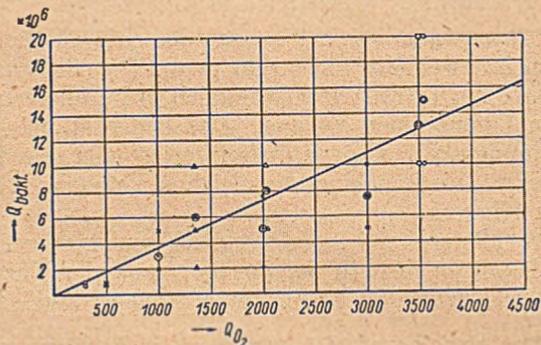


Fig. 7. Beziehungen zwischen oxydatischer (Q_{O_2}) und bakteriostatischer (Q_{bact}) Aktivität verschiedener Präparate.

- | | | | | | |
|---|---------------------------|---|---------------------------|-------------|---|
| ○ | } Aceton-Fraktionierungen | △ | } Alkohol-Äther-Fällungen | ▲ | Aceton-Fraktionierung + Benzoesäure-Fällung |
| * | | □ | | } Fällungen | |
| × | | | | | |
| + | | | | | |
| • | | ◇ | Ammonsulfat-Fällung | ▽ | Uran-Fällung |

gebracht. Es handelt sich zumeist um Alkohol-Äther-Fällungen und Produkte der Acetonfraktionierung sowie eine Ammon-sulfatfällung. Nähere Angaben enthält die Legende zu Fig. 7. Angegeben sind als Ordinaten die experimentell gefundenen Q_{bact} -Werte, d. h. die das Bakterienwachstum gerade noch unterbindenden Verdünnungen, als Abszissen die $Q_{0,2}$ -Werte. Da von den meisten Präparaten die Wachstumsgrenze mehr als zweimal bestimmt worden ist, ist der Mittelwert dieser Bestimmungen — mit einem Kreis umgeben — ebenfalls eingetragen worden.

Berücksichtigt man die oben erwähnten großen Versuchsfehler sowie eine gewisse Unsicherheit älterer, mit zu großer Enzymmenge bestimmter Q_{O_2} -Werte (S. 202 u. 215) — wozu noch die einstweilen nicht berücksichtigte Rolle wechselnden *Katalase*-gehalts der Präparate kommt (Näheres S. 218/219) —, dann bleibt doch als Hauptergebnis der Fig. 7 eine annähernde Proportionalität von enzymatischer und bakteriostatischer Wirkung bestehen, wie sie andeutungsweise schon in der letzten Mitteilung³⁾ beobachtet worden war¹⁷⁾. Danach wäre also die Glucoseoxydase *identisch* mit dem bakteriostatisch wirksamen Agens (Penatin, Notatin, Penicillin B).

Es soll hier aber nicht verschwiegen werden, daß bei einigen weiteren Präparaten diese Beziehung zwischen Q_{O_2} und Q_{bact} durchbrochen war, ohne daß die Ursache — die nicht immer die gleiche zu sein braucht — ausreichend geklärt werden konnte.

Hier sei beispielsweise der Fall einer *Tanninfällung* $Q_{O_2} = 2150$ (S. 212) erwähnt, die in zwei zu verschiedenen Zeiten ausgeführten Versuchen nur die Q_{bact} -Werte 20000 und 50000 aufwies, während nach Fig. 7 etwa das 200fache zu erwarten gewesen wäre. Wir halten es für wahrscheinlich, daß Präparate dieser Darstellungsweise, die eine Tendenz, in Wasser unlöslich zu werden, zeigen, die Bakterienfilter mit der Porengröße $1-2 \mu$ nur zum kleinen Teil passieren. Ähnliches gilt vielleicht für eine Reinecke-Salzfällung ($Q_{O_2} = 1700$, $Q_{\text{bact}} = 10000$).

In anderen Fällen scheint die besondere *Unbeständigkeit* von Enzympräparaten zu Diskrepanzen zu führen, zumal die bakteriostatische Prüfung meist erst mehrere Tage nach der enzymatischen erfolgte. Dieser Fall dürfte z. B. gegeben sein beim Eluat einer *Uranfällung* ($Q_{O_2} = 5100$), das im ersten Wachstumsversuch ein Q_{bact} von 10000000, tags darauf aber nur mehr von 1000000 ergab. Ähnliches gilt für das Eluat einer $Al(OH)_3$ -Adsorption ($Q_{O_2} = 6500$, S. 209), die anfangs $Q_{\text{bact}} = 8000000$ lieferte und dann gleichfalls enorm abfiel.

Ungeklärt bleibt die niedrige Aktivität $Q_{\text{bact}} = 200000$ einer eluierten *Benzoesäurefällung* von $Q_{O_2} = 1235$. Es ist immerhin auffallend, daß alle Präparate, die mit *konzentriertem Aceton* in Berührung gekommen sind, abnorm tiefe Wachstumsgrenzen zeigen. Vielleicht bewirkt diese Behandlung ein teilweises Unlöslichwerden (bei im wesentlichen erhaltener enzymatischer Aktivität), das erst bei der Filtration in Erscheinung tritt.

Eine gleichfalls ungeklärte, aber reproduzierbare Erscheinung wurde bei einem „Mischpräparat“ $Q_{O_2} = 1360$ (Alkohol-Äther- + Aceton- + Benzoesäurefällungen) beobachtet. Es zeigte einen normalen Q_{bact} -Wert von 6000000; bei 1:500000 bis 1000000 trat erneut Wachstum auf und bei 1:20000 zeigte sich eine zweite Wachstumsgrenze. Vielleicht überlagert hier ein *Wuchsstoffeffekt* den antibiotischen (siehe später S. 220).

¹⁷⁾ Q_{bact} ist jetzt in Präparaten vergleichbarer Wirksamkeit um 1—2 Größenordnungen höher als in den damaligen orientierenden Versuchen, in denen die Testbedingungen offenbar noch nicht optimal gewesen waren.

2. Zum Mechanismus der bakteriostatischen Wirkung

Es ist die allgemeine Auffassung der über hochmolekulare Mycoine arbeitenden Autoren^{3, 6, 7, 18, 18a}), daß *Hydroperoxyd* das eigentlich antibakteriell wirkende Agens bei ihrer Funktion ist und daß darum Abwesenheit merklicher Mengen von *Katalase* die Voraussetzung ihrer Wirksamkeit ist. Es schien in diesem Zusammenhang von Interesse, einmal den Katalasegehalt verschiedener Präparate von Glucoseoxydase vergleichend festzustellen. Dies geschah bei 30° im Ansatz der Tab. 15, die zugleich die zu verschiedenen Versuchszeiten gemessenen O₂-Volumina enthält.

Tab. 15

1 ccm Enzymlösung (= 0,05 mg), zuletzt zugekippt
 2 „ m/15-Phosphatpuffer p_H 6,8
 1 „ m/13-H₂O₂
 1 „ H₂O

Min.	Enzympräparat	cmm O ₂				ohne Enzym
		305	430	1500	3000	
2,5		106	11	118	293	3
5		177	21	194	383	6
10		270	46	290	465	18
15		333	59	353	490	21
30		450	88	465	510	36
45		515	96	500	520	42
60		555	105	528	530	60

O₂-Kapazität des eingesetzten H₂O₂: 860 cmm.

Es besteht ersichtlich keine Beziehung zwischen Q_{O₂} und Katalasegehalt der Enzympräparate. Während der letztere im Präparat Q_{O₂}=430 gering ist, ist er in den anderen Fällen in Anbetracht der kleinen Enzymmenge sehr beträchtlich¹⁹⁾.

Bildet man aus den 2,5 Min.-Werten (nach Abzug des Kontrollwerts *ohne Enzym*) die monomolekularen Reaktionskonstanten *k*_{kat}, umgerechnet auf 1 mg Enzym, so erhält man für das Enzym mit

Q _{O₂}	305	430	1500	3000
<i>k</i> _{kat}	1,02	0,074	1,14	3,28.

¹⁸⁾ W. Kocholaty, Arch. Biochem. 2, 73 (1943).

^{18a)} K. Wallenfels, Chemie 58, 1 (1945).

¹⁹⁾ Deutlich ist auch die durch relativ hohe H₂O₂-Konzentration und Versuchstemperatur bei längeren Versuchszeiten hervorgerufene starke Enzymschädigung. Vgl. hierzu z. B. K. Zeile, Erg. Enzymforsch. 3, 265 (1934), im besonderen für *Pilzkatalase* P. Waentig u. o. Steche, Hoppe-Seylers Z. 76, 77 (1911).

Daraus läßt sich berechnen, daß bei Gegenwart von 1 mg Enzym nach 1 Minute vom eingesetzten H_2O_2 jeweils noch vorhanden sind²⁰⁾

in %	37	93	32	4.
----------------	----	----	----	----

Diese Werte lassen sich nun in annähernde Beziehung setzen zur *oxydatischen* Wirksamkeit der Präparate. Für katalasefreie Präparate, bei denen also Reaktionsgleichung I (S. 199) ausschließlich gilt, würde man erhalten aus

Q_{O_2}	305	430	1500	3000
cmm O_2				
mg Enzym \times Min.	5,08	7,17	25,0	50,0
entspr. μ Mol $H_2O_2/5$ cem	0,23	0,32	1,12	2,24.

(In Wirklichkeit enthielten die von uns verwendeten Präparate stets mehr oder weniger große Mengen Katalase, reagieren als nach Gleichung



weiter. Für den Grenzfall, daß gar kein H_2O_2 nachweisbar ist²¹⁾, sind also die obigen Werte von Q_{O_2} , cmm O_2 /mg Enzym \times Min. und μ Mol H_2O_2 für die *Primärreaktion* zu verdoppeln. Bei den folgenden rohen Schätzungen soll dieser zwischen 1 und 2 liegende Faktor unberücksichtigt bleiben.)

Bei linearem Reaktionsverlauf beträgt die *mittlere* H_2O_2 -Konzentration während der 1. Minute für die 4 verschiedenen Präparate

μ Mol $H_2O_2/5$ cem	0,115	0,16	0,56	1,12.
------------------------------------	-------	------	------	-------

Davon würden in erster Annäherung infolge gleichzeitiger Katalasewirkung nach 1 Min. noch vorhanden sein

μ Mol $H_2O_2/5$ cem	0,0425	0,149	0,179	0,045.
------------------------------------	--------	-------	-------	--------

Wäre also die bakteriostatische Wirkung nur von der sich einstellenden H_2O_2 -Konzentration abhängig, dann würden einfache Beziehungen zum Q_{O_2} -Wert der Präparate nicht mehr zu erwarten sein. Unsere Erfahrungen sprechen aber ersichtlich dagegen. So zeigte beispielsweise das Enzympräparat mit $Q_{O_2} = 3000$ und besonders hohem Katalasegehalt die recht erhebliche und nicht eben anormale bakteriostatische Wirkung von $Q_{bact} = 8.00000$ (vgl. Fig. 7).

Nach diesen Befunden ist also *Katalasefreiheit* der Präparate keineswegs Voraussetzung ihrer antibakteriellen Wirksamkeit. Dazu kommt noch, daß auch *Staphylokokken* nach Untersuchungen von A. Fujita und T. Kodama²²⁾ beträchtliche Mengen Katalase enthalten. Zur Deutung der Befunde ist darauf hinzuweisen, daß Angaben, nach denen auch bei Katalasegegenwart *peroxydatischer* Verbrauch von H_2O_2 nachweisbar ist, in der Fermentliteratur keineswegs selten sind.

Es sei hier an die *Sekundäroxidation* leicht oxydabler Stoffe wie Nitrit, p-Phenylendiamin, Brenztraubensäure u. a. bei der Wirkung etwa der *Aldehyd-* bzw. *Xanthin-*

²⁰⁾ Dies gilt in allgemeinerer Form nur für niedere H_2O_2 -Konzentrationen (etwa $< 0,015$ m), in deren Bereich k_{kat} annähernd konstant ist. Vgl. K. Zeile bei H. v. Euler, Chemie der Enzyme II, 3, S. 42f. (München 1934).

²¹⁾ Leider konnte die systematische Bestimmung der H_2O_2 -Bildung verschiedener Präparate nicht mehr vorgenommen werden. Es sei jedoch darauf hingewiesen, daß in der II. Mitt.²⁾ selbst unter *optimalen* Bedingungen (pH 6, 0,8 m-Glucose, reiner O_2) mit Enzym von $Q_{O_2} = 830$ und 2500 nach 1 Std. nur 4 bzw. 7% der nach Gleichung I zu erwartenden theoretischen H_2O_2 -Menge gefaßt werden konnten.

²²⁾ Biochem. Z. 232, 30 (1931).

dehydrase^{23,24}) der Milch, der *Uricase*²⁴), der *Aminosäuredehydrase*^{24,25}), der *Amindehydrasen*^{26,27}); der *Dioxymaleinsäuredehydrase*²⁸) usw. erinnert. In der I. Mitt. dieser Reihe²) ist auch für Rohpräparate von *Glucoseoxydase* die gekoppelte Oxydation von p-Phenylendiamin nachgewiesen worden. Ferner haben Keilin und Hartree²⁴) 1936 die überraschende Beobachtung gemacht, daß bei H_2O_2 -„Abfangversuchen“ mit Alkohol als Sekundärsubstrat Katalase *peroxydatisch* zu wirken vermag.

Allgemein gewinnt man den Eindruck, daß bei der Konkurrenz von katalatischem und peroxydatischem H_2O_2 -Umsatz der letztere bevorzugt erfolgt. Es spricht einstweilen nichts gegen die Auffassung, daß in der eben aufgezeigten Weise bei den bakteriostatischen Versuchen durch intermediär gebildetes H_2O_2 ein lebenswichtiger Bestandteil der Bakterien oder wahrscheinlicher eine Komponente der Nährlösung (etwa ein *Wuchsstoff*, z. B. Biotin) oxydiert und damit ausgeschaltet wird²⁹). Ob bei gleichem Q_{O_2} wesentlich katalaseärmere Präparate erheblich größere bakteriostatische Effekte zeigen würden, ist noch nicht geprüft worden, aber wahrscheinlich.

Zuletzt sei noch die Frage nach Q_{O_2} - und Q_{bact} -Wert des reinen Wirkstoffs kurz gestreift. Nach Raistrick u. Mitarb.⁶) ist *Notatin* noch in der Verdünnung 1:1000000000, nach Doisy u. Mitarb.^{7b}) *Penicillin B* in der Verdünnung 1:1 bis 60000000000³⁰) gegenüber *Staph. aureus* wirksam. Zur Berechnung des Q_{O_2} -Werts von Reinpräparaten ist leider nur eine — auch nicht ganz eindeutige — Angabe in der zweiten Veröffentlichung Doisy's verwertbar. „Eine Lösung von Penicillin B (0.1 mg pro cem) in 0,1proz. Glucose wurde mit O_2 durchlüftet und bei 36° im Wasserbad gehalten.“ Nach 30, 60 und 120 Min. wurden Glucose, Gluconsäure und H_2O_2 in 100 cem Reaktionsmischung bestimmt. Glucoseverbrauch einerseits, Gluconsäure- und H_2O_2 -Bildung andererseits standen annähernd im Verhältnis 1:1:1 (was gegen nennenswerten peroxydatischen H_2O_2 -Umsatz spricht, Aus dem 30-Min.-Mittelwert berechnet sich, auf Glucose bezogen, eine monomolekulare Geschwindigkeitskonstante $k = 0,0285$ und hieraus nach Gleichung I, S. 199, ein Anfangs- Q_{O_2} von 187000 (falls tatsächlich im *G* *samtansatz* nur 0,1 mg Penicillin vorhanden war). Rechnet man auf Grund der von Franke u. Lorenz¹⁰) aufgenommenen Aktivitäts-pS-Kurve die verwendete Anfangs-Substratkonzentration von $m/180$ - auf die von uns stets verwendete von $m/5$ - um, so wäre dieser Wert $\times 5$ zu nehmen, während er für die Umrechnung von reinem O_2 auf Luft nach der gleichen Arbeit und nach

Fig. 1 dieser Mitteilung durch 2 zu dividieren wäre, was $\frac{187000 \times 5}{2} = 470000$ ergäbe. Schließlich wäre noch zu berücksichtigen, daß die angewandte Durchlüftung

²³) S. Thurlow, *Biochem. J.* **19**, 175 (1925). — D. C. Harrison u. S. Thurlow, *Biochem. J.* **20**, 217 (1926). — D. C. Harrison, *Biochem. J.* **23**, 982 (1929).

²⁴) D. Keilin u. E. F. Hartree, *Proc. Roy. Soc. London (B)* **119**, 114, 141 (1936).

²⁵) E. Negelein u. H. Brömel, *Biochem. Z.* **300**, 225 (1939).

²⁶) H. J. Kohn, *Biochem. J.* **31**, 1693 (1937).

²⁷) E. A. Zeller, *Helv. chim. Acta* **21**, 881 (1938).

²⁸) J. Banga u. E. Philippot, *Hoppe-Seylers Z.* **258**, 147 (1939).

²⁹) Diese Auffassung vom grundsätzlichen Wirkungsmechanismus der Glucoseoxydase gegenüber Bakterien wird weiter gestützt durch den von F. Lipmann u. C. R. Oven (*Science* **98**, 246; 1943) neuerdings geführten Nachweis, daß auch die *Xanthindehydrase* der Milch gegenüber *Staph. aureus* bakteriostatisch wirksam ist (in der Verdünnung 1:1000000, bezogen auf das reine Ferment).

³⁰) *Experimentell belegt* sind allerdings in der Arbeit von Doisy u. Mitarb. nur wirksame Verdünnungsgrade bis maximal 1:128000000.

mit O_2 wohl die intensivste Form der Berührung mit diesem Gas darstellt und wenigstens der Schüttelgeschwindigkeit 160 T/Min. in den Versuchen der Fig. 2 (S. 203) ebenbürtig ist. Für die Umrechnung auf die Bedingungen unserer Normalversuche (S. 201) ist daher noch $470000/1,33 = 350000$ anzusetzen.

Die bakterio-statische Aktivität des Präparats ist in der amerikanischen Arbeit nicht angegeben. Beim Vergleich der enzymatischen Aktivität des obigen katalase-freien Präparats mit unseren noch mehr oder weniger stark katalasehaltigen ist noch zu bedenken, daß unsere Q_{O_2} -Werte mit einem Faktor zu multiplizieren sind, der zwischen 1 und 2 liegt (S. 219). Extrapolieren wir von unserem Präparat mit $Q_{O_2} = 3500$ und $Q_{bact} = 15000000$ (unter Verwendung des Faktors 1,5), dann würde sich für Doisy's Präparat Q_{bact} zu rund 1000000000 ergeben, ein immerhin plausibler Wert. Andererseits würde aus diesen Berechnungen folgen, daß unsere bisher besten Präparate weniger als 10 Prozent des reinen Wirkstoffs Glucoseoxydase enthalten dürften [vgl. auch ²⁾].

Frau Margarete Schöllhorn danken wir für fleißige und geschickte Mitarbeit. Der Firma Knoll A.-G., Ludwigschafen, sind wir für finanzielle Unterstützung dieser Untersuchung sehr verbunden.

Zur Autoxydation der ungesättigten Fettsäuren

V. Die Wirkung der Soja-Lipoxydase

Von Wilhelm Franke, Joseph Mönch, Dora Kibat und Annemarie Hamm

Mit 5 Figuren im Text

(Aus dem Institut für organisch-chemische Technologie und Gärungschemie der Universität Würzburg.)

[Eingelaufen am 23. Januar 1947.]

In der letzten Mitteilung dieser Reihe¹⁾ war versucht worden, auf präparativem Wege den Ort des primären O_2 -Angriffs bei der kobalt-katalysierten Autoxydation freier Linol- und Linolensäure in Substanz festzulegen. Es hatte sich dabei gezeigt, daß in der Phase annähernd quantitativer Brückenperoxydbildung zunächst die carboxylferne Doppelbindung angegriffen wird, während sich die Ölsäure-Doppelbindung als reaktionsträge erwies. Im Falle der Linolensäure beginnt sehr bald auch die mittlere Doppelbindung mit O_2 zu reagieren.

Es schien von Interesse, die Verhältnisse auch einmal unter den andersartigen Bedingungen (fettsaure Salze in wäßriger Lösung) der enzymatisch katalysierten Autoxydation nachzuprüfen. Eine derartige Untersuchung lag um so näher, als die in Frage kommenden Enzyme, „Lipoxydasen“ genannt, in letzter Zeit im Ausland eine ziemlich ein-

¹⁾ IV. Mitt. W. Franke u. J. Mönch, A. 556, 200 (1944).

gehende Bearbeitung gefunden haben^{2,3,4,5,6}), ohne daß über den Chemismus der Fermentreaktion bisher mehr bekannt geworden wäre, als daß dabei primär *Peroxyde*²⁻⁶) und später wahrscheinlich *Carbonylverbindungen*^{5d}) auftreten.

Bei der eigenartigen Kinetik der Enzymwirkung war es vor den präparativen Hauptversuchen erforderlich, einige orientierende Versuche über die optimalen Wirkungsbedingungen des Ferments durchzuführen. Die enzymatische Seite der Reaktion (Vorkommen, Isolierung und Reinigung, Eigenschaften und Beeinflussbarkeit des Enzyms) wird in einer folgenden Mitteilung noch eingehendere Bearbeitung finden.

Versuche.

I. Das Enzymmaterial

A. Darstellung. Nach den Literaturangaben scheinen *Sojabohnen* das meistverwendete und aktivste Ausgangsmaterial der Enzymdarstellung zu sein. Wir arbeiteten anfangs mit wäßrigen und dialysierten Extrakten eines mehrere Jahre alten käuflichen Sojabohnenmehls (präpariert, Merck); die Lösungen zeigten im später (S. 223) näher beschriebenen Aktivitätstest (mit Linolensäure als Substrat) Q_{O_2} -Werte zwischen 60 und 110. Anschließend gingen wir dazu über, frisch gekeimte Sojabohnen⁷) mit Wasser zu extrahieren und die bereits sehr viel aktiveren Ausgangslösungen fraktioniert mit Ammonsulfat zu fällen; die wirksamsten, durch 65 %ige Ammonsulfatsättigung erhaltenen Enzympräparate wiesen Q_{O_2} -Werte von 6000—12000 auf⁸). Ein typischer Aufarbeitungsgang verlief folgendermaßen:

Man läßt 65 g Sojabohnen (Bonn, Typ XI, schwarz glänzend) $\frac{1}{2}$ Tag in Leitungswasser quellen und anschließend 3—4 Tage in Petrischalen auf durchfeuchtem Filtrierpapier bei 30° keimen⁹). Das gekeimte Material (Gewicht 140 g) wird von der Schale befreit, durch den Fleischwolf getrieben und 2 Stunden in der Kugelmühle

²) J. B. Sumner u. Mitarb., *Enzymol.* 7, 130 (1939); *J. biol. Chem.* 134, 531 (1940).

³) H. Tauber, *Am. chem. Soc.* 62, 2251 (1940).

⁴) H. H. Strain, *Am. chem. Soc.* 63, 3542 (1941).

⁵) H. Süllmann, *Helv.* a) 24, 465 (1941); b) 24, 646 (1941); c) 24, 1360 (1941); d) 25, 521 (1942); e) 26, 1114 (1943); f) 26, 2253 (1943); g) 27, 789 (1944).

⁶) A. K. Balls, B. Axelrod u. M. W. Kies, *J. biol. Chem.* 149, 491 (1943).

⁷) Herrn Prof. Dr. F. Boas, Botan. Institut der Techn. Hochschule München, und Herrn Prof. Dr. F. Overbeck, Institut f. landwirtschaftl. Botanik d. Universität Bonn, sind wir für die kostenlose Überlassung von einigen Kilogramm Sojabohnen zu großem Dank verpflichtet.

⁸) In einigen Punkten hielten wir uns bei der Enzymreinigung an Angaben von Balls, Axelrod u. Kies⁶). Leider geben die Autoren keine vergleichbaren quantitativen Daten über den Erfolg der Enzymanreicherung; zudem arbeiten sie nicht mit dem manometrischen Test, sondern mit kolorimetrischen Methoden (Ausbleichung einer Carotin-Äthyllinolat-Suspension bzw. Peroxyd-Bestimmung mit $FeSO_4 + NH_4CNS$ in Methylalkohol).

⁹) Zur Methodik vgl. H. Kraut u. Ä. Weischer in Bamann-Myrbäck, *D. Meth. d. Fermentforsch.* 2, 1179 (Leipzig 1941).

mit dem 5fachen Vol. dest. Wasser extrahiert („Suspension“¹⁰⁾). Es wird zentrifugiert und die milchig getrübe Flüssigkeit über Nacht bei 3° im Gutbierschen Schnell-dialysator gegen laufendes dest. Wasser dialysiert („Rohextrakt dialysiert“). Die Lösung wird mit festem Ammonsulfat bis zu 75proz. Sättigung versetzt und der entstandene Niederschlag, der sich selbst im *Cepa*-Separator bei 45000 Umdr./Min. nicht befriedigend abzentrifugieren ließ, über Nacht im Kälteraum durch ein Faltenfilter abfiltriert. Er wird in etwa 250 ccm Wasser gelöst und wiederum über Nacht dialysiert („I. Ammonsulfatfällung [75 %] gelöst“). Aus der Lösung (ca. 500 ccm) wird durch Zugabe von Ammonsulfat bis zum Sättigungsgrad 25 % fast inaktives Material ausgefällt und nach dem Zentrifugieren durch weiteren Ammonsulfatzusatz bis zum Sättigungsgrad 65 % das gereinigte Enzym niedergeschlagen, das erneut in 250 ccm Wasser gelöst und dialysiert wird („II. Ammonsulfatfällung [65 %] gelöst“).

Die nachfolgende Tab. 1 enthält Angaben über *Aktivität* und *Ausbeute* für die einzelnen Reinigungsstufen. Die *Aktivität* wird durch die „Atmungsgröße“ Q_{O_2} unter bestimmter Bedingungen (siehe später) ausgedrückt, das Produkt $Q_{O_2} \times \text{mg Enzym-Trockengewicht}$ ergibt die *Enzymeinheiten* (E.E.).

Tab. 1

Reinigungsstufe	Q_{O_2}	mg Tr.- gew. im ccm	ccm Lösung	E.E.	% Ausbeute
Suspension	185	40,0	1000	7400000	(100)
Rohextrakt dialysiert	322	22,7	1050	7650000	103
I. Ammonsulfatfällung (75 %) gelöst	1115	12,2	500	6820000	92
II. Ammonsulfatfällung (65 %) gelöst	6000	2,5	445	6700000	90,5

Mit ganz geringen Verlusten ließ sich also durch Dialyse und wiederholte Ammonsulfatfällung eine 32fache Anreicherung der Lipoxydase erzielen.

Ein orientierender Versuch wurde auch mit frisch den Schoten entnommenen *Erbsen* durchgeführt. Der dialysierte Rohextrakt zeigte hier die Aktivität $Q_{O_2} = 29$, die dialysierte Ammonsulfatfällung (Sättigungsgrad 90 %) $Q_{O_2} = 44$.

Ferner wurde nach einem Vorschlag Süllmanns^{5f)} Soja-Rohextrakt bei 5° mit dem doppelten Vol. *Aceton* gefällt. Die Aktivität der Fällung war jedoch geringer als die des Rohextraktes.

Die bisher reinsten Lipoxydase-Lösungen sind fast klar und gelblich gefärbt. Sie lassen sich ohne Verlust i. V. bei 40–45° einengen. *Octylalkohol*zusatz hat wenig Einfluß auf die Enzymaktivität. Bei 3–5° in Gegenwart von Octylalkohol aufbewahrt, verliert das Enzym in 14 Tagen $\frac{1}{3}$ bis $\frac{1}{4}$ seiner anfänglichen Wirksamkeit.

B. Aktivitätsbestimmung. Die Testung der Fermentpräparate erfolgte unter annähernd optimalen Bedingungen zumeist in folgendem Ansatz bei 20° (späterhin stets als „Normalansatz“ zitiert):

je 1 ccm Enzymlösung, m/10-Na-Linolenat, m/5-Phosphatpuffer p_H 6,8–2 ccm H_2O .

¹⁰⁾ Eine zweite Extraktion mit der halben Wassermenge erhöhte die Enzymausbeute um 20–30 %; es wurde zumeist auf sie verzichtet.

Die O_2 -Aufnahme in Luft wurde nach der Warburg-Methodik manometrisch bestimmt. Da die Reaktionsgeschwindigkeit aus später ausgeführten Gründen meist rasch absinkt, wurde der Aktivitätswert $Q_{O_2} = \frac{\text{cm O}_2}{\text{mg Enzym} \times \text{Std.}}$ fast durchweg aus dem 5-Minuten-Wert der O_2 -Aufnahme berechnet.

Die Eigenatmung des Enzyms und die Autoxydation der fettsauren Salze spielte nur bei schwach aktivem Enzym eine quantitativ ins Gewicht fallende Rolle und wurde dort in substrat- bzw. enzymfreien Ansätzen berücksichtigt.

Füllung des Mitteleinsatzes der Warburg-Gefäße mit KOH erübrigte sich da unter unseren Versuchsbedingungen mit und ohne KOH innerhalb der Fehlergrenzen gleiche Unterdrücke beobachtet, also keine nennenswerten CO_2 -Mengen gebildet wurden.

II. Die Reaktionskinetik

Sie wird weitgehend durch die starke, von den Reaktionsprodukten ausgeübte *Enzymschädigung* bestimmt, die bewirkt, daß die Reaktion im allgemeinen lange vor Aufnahme eines O_2 -Moleküls pro Molekül der mehrfach ungesättigten Fettsäure zum Erliegen kommt. Daß es sich hier tatsächlich um eine Erschöpfung des Ferments, nicht des Substrats, handelt, zeigt Fig. 1, wo nach dem Abklingen der Reaktion einmal die *Enzymzugabe* (I), ein andermal die *Substratzugabe* (II) wiederholt wurde.

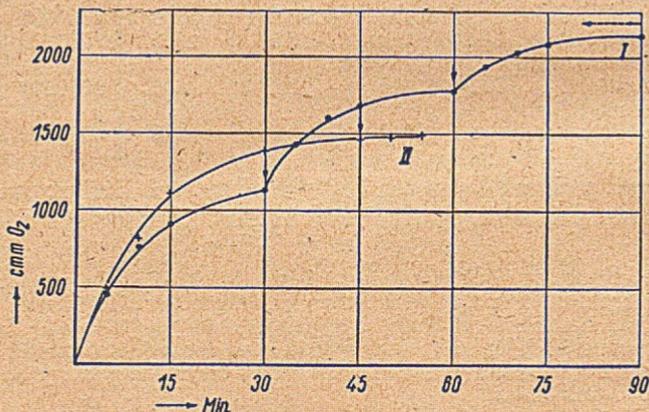


Fig. 1. Normalansätze bei 20°. Im Ansatz der Kurve I wurde nach 30 und 60 Min. (↓) erneut 1 cm Enzymlösung ($Q_{O_2} = 825$), im Ansatz der Kurve II nach 45 Min. (↓) 1 cm m/10-Na-Linolenat nachgekipp. O_2 -Äquivalent einer Doppelbindung 2240 cm O_2 (←.....).

A. Temperatureinfluß. Mit steigender Temperatur nimmt die Fermentschädigung stark zu, so daß die bei längerer Versuchsdauer erreichten O_2 -Aufnahmen im 20°-Versuch erheblich höher liegen als im 37°-Versuch (Fig. 2). Die Anfangsgeschwindigkeiten sind dagegen innerhalb der Versuchsfehler fast gleich.

B. Der Einfluß der Enzymkonzentration geht aus Fig. 3 hervor. Nur im Bereiche der kleinsten Enzymzusätze besteht an-

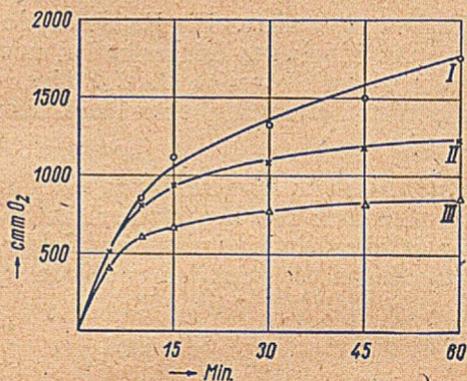


Fig. 2. Normalansätze bei 20° (I), 30° (II) und 37° (III). Enzymaktivität $Q_{O_2} = 175$.

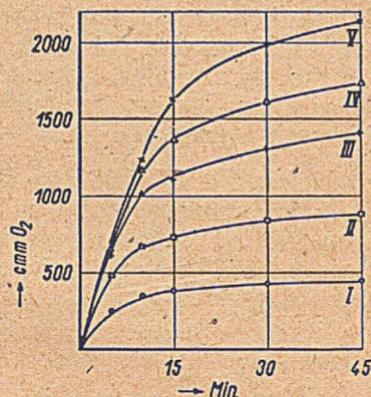


Fig. 3. Dem Normalansatz analoge Linolenatansätze bei 20° mit 0,1 ccm (I), 0,25 ccm (II), 0,5 ccm (III), 1,0 ccm (IV) und 1,5 ccm (V) Enzymlösung. Q_{O_2} ber. aus I = 12300. O_2 -Äquiv. einer Doppelbindung 2240 ccm.

nähernde Proportionalität zwischen Anfangsgeschwindigkeit und Enzymkonzentration, bei größeren Enzymmengen wird eine wohl physikalisch (durch die O_2 -Diffusion) bedingte Grenzgeschwindigkeit der O_2 -Aufnahme erreicht. Andererseits liegt bei höheren Fermentkonzentrationen der schließlich erreichte Wert der O_2 -Aufnahme höher als bei niedrigeren, da im ersteren Fall die stets vorhandene Fermentschädigung weniger stark ins Gewicht fällt.

C. Über den Einfluß der Substratkonzentration unterrichtet Fig. 4 am Beispiel der Linolsäure. Maximale Anfangsgeschwindigkeit ist bei einer Linolsäure-Konzentration von $m/100$ erreicht; sie bleibt (sicher wieder aus physikalischen Gründen) bei weiterer Steigerung der

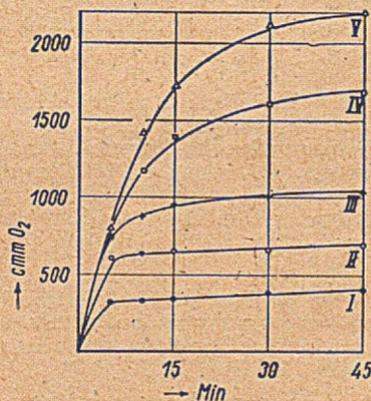


Fig. 4. Dem Normalansatz analoge Linolatansätze bei 20° mit 0,1 ccm (I), 0,25 ccm (II), 0,5 ccm (III), 1,0 ccm (IV) und 1,5 ccm (V) $m/10$ -Substratlösung. Q_{O_2} des Enzyms = 3200.

Substratkonzentration aufs Dreifache unverändert. Die Endabsorptionen an O_2 nehmen bei Erhöhung der Linolsäure-Konzentration um 15fache nur um $5\frac{1}{2}$ fache zu, worin wieder die verstärkte Schädigung der gleichen Enzymmenge durch erhöhte Peroxydkonzentrationen zum Ausdruck kommen dürfte.

D. Der Einfluß des O_2 -Partialdrucks ist gering, wie aus den in Tab. 2 zusammengestellten Parallelreihen mit Luft und reinem O_2 hervorgeht. Die Anfangsgeschwindigkeiten sind innerhalb der Fehlergrenzen fast gleich, das spätere Abklingen der Reaktion erfolgt in O_2 etwas langsamer als in Luft.

Tab. 2

Normalansätze mit wechselnden Enzymmengen in reinem O_2 und in Luft.
cmm O_2 .

Zeit (Min.) \ Enzymlösung cmm	Reiner O_2				Luft			
	0,25	0,50	0,75	1,0	0,25	0,50	0,75	1,0
5	26	140	326	371	24	190	351	310
10	36	200	457	511	40	260	465	444
15	46	225	535	608	44	297	522	502
30	67	277	670	766	56	338	612	598
45	77	304	729	832	68	354	642	643

E. Der p_H -Einfluß wurde in größerem Bereich unter Verwendung des von T. Teorell und E. Stenhagen^{10a)} angegebenen *Universalpuffers* und im physiologisch besonders wichtigen Gebiet zwischen p_H 5,3 und 8,3 nochmals unter Verwendung von *Phosphatpuffer* untersucht.

Die im übrigen dem Normalansatz nachgebildeten Ansätze enthielten entweder 2 ccm Universalpuffer der unten angegebenen Zusammensetzung oder 3 ccm m/5-Phosphatpuffer. Bei längerer Versuchsdauer zeigt der p_H -Wert der Ansätze sinkende Tendenz. Während der Abfall im größten Teil des untersuchten p_H -Bereichs nur wenige Zehntel ausmacht, steigt er im Gebiet $> p_H$ 10 auf eine p_H -Einheit und darüber an. Der Fig. 5 sind Mittelwerte zwischen Anfangs- und End- p_H zugrundegelegt.

^{10a)} Biochem. Z. 299, 416 (1938). Wir verdünnten die PufferstammLösung zur Erhöhung der Pufferkapazität nur auf 25 (statt wie angegeben 100) ccm, so daß sich folgende Molaritäten der einzelnen Bestandteile in den gebrauchsfertigen Pufferlösungen ergaben: H_3PO_4 0,04, H_3BO_3 0,046, Citronensäure 0,027. Die p_H -Einstellung erfolgte dabei mit n/1-HCl.

Fig. 5. p_H -Reihen.
 I (*) O_2 -Aufnahmen nach 5 Min.
 Universalpuffer.
 Ia (o) O_2 -Aufnahmen nach 45 Min.
 Universalpuffer.
 II (+) O_2 -Aufnahmen nach 5 Min.
 Phosphatpuffer.
 Q_{O_2} des Enzyms (im Normalansatz)
 = 1160.

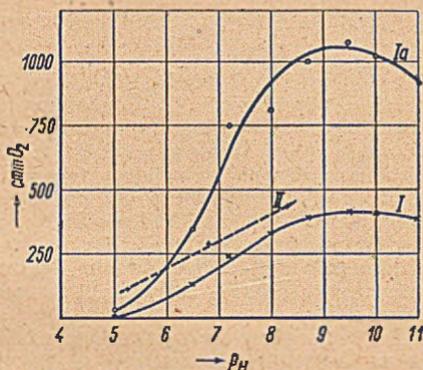


Fig. 5 zeigt die für ein pflanzliches Ferment überraschende Tatsache, daß das Wirkungsoptimum im *alkalischen* Gebiet (bei etwa p_H 9,5) liegt, während bei p_H 5 die Wirkung im Universalpuffer praktisch vollständig, in Phosphatpuffer zum größten Teil verschwunden ist. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß bei p_H 5 das Enzym offenbar zum Teil ausgefällt ist. Phosphat- und Universalpuffer-Kurve laufen einander übrigens annähernd parallel. Der Befund, daß die Reaktion im alkalischen Gebiet nicht nur mit größerer Anfangsgeschwindigkeit verläuft, sondern auch zu überproportional gesteigerten Endabsorptionen führt, bedarf hinsichtlich seiner Ursachen noch näherer Untersuchung^{10b)}.

III. Zum Chemismus der Enzymreaktion

A. Peroxydbestimmungen. Daß bei der Wirkung der Lipoxydase primär *Peroxyde* gebildet werden, wird in den S. 222 zitierten Arbeiten wiederholt angegeben; nur in zwei Fällen^{2,6)} ist jedoch — zudem mit mangelhaften Methoden — der Versuch gemacht worden, das Ausmaß der Peroxydbildung quantitativ zu bestimmen. Versuche, O_2 -Aufnahme und Peroxydbildung in quantitative Beziehung zueinander zu setzen, fehlen bisher vollständig. Sie wurden daher nach dem in der III. Mitt. dieser Reihe⁴⁾ erprobten und für den vorliegenden Fall

^{10b)} Nach Abschluß der Untersuchung wurden uns in diesem Zusammenhang interessierende pflanzenphysiologische Beobachtungen D. S. van Fleets (Am. chem. Soc. 65, 710 [1943]) bekannt. „Wurzel- und Stengelgewebe von 6 Arten von Getreidepflanzen, die in gepufferten Nährlösungen bei p_H 7,2—7,6 gewachsen waren, hatten hohe Oxydaseaktivität in Fettgeweben im Keimlingsstadium, doch war nach Ablauf von 5 Wochen der Vorrat an ungesättigtem Fett sehr niedrig und die Fettgewebe waren durch niedere Oxydaseaktivität und die Anwesenheit von Fettabbauprodukten charakterisiert. Die umgekehrten Verhältnisse wurden erhalten im Falle von Pflanzen, die in gepufferten Lösungen bei p_H 4,8—5,6 gewachsen waren. In relativ sauren Medien gewachsene Pflanzen zeigten eine höhere Fetttanhäufung und eine niedrigere Oxydaseaktivität.“

⁴⁾ W. Franke u. D. Jerchel, A. 533, 46 (1937).

wäßriger Seifenlösungen nur etwas zu modifizierenden Verfahren durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurden 10—15 bei 20° parallel laufende Normalansätze nach Erreichung bestimmter O₂-Aufnahmen (20—25% der für Peroxydierung aller Doppelbindungen errechneten) vereinigt, mit 20 ccm 2*n*-H₂SO₄ angesäuert und dreimal mit je 40 ccm Äther ausgeschüttelt. Die auf der Zentrifuge abgetrennten Ätherschichten wurden nach Vereinigung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und i. V. eingedunstet, die gewogenen Rückstände mit 5 ccm eines Gemisches von 0,75 ccm konz. wäbr. HJ (d = 1,96), 1,75 ccm Eisessig und 2,5 ccm CCl₄ versetzt und eine Stunde unter CO₂ stehen gelassen; nach Zugabe von 20 ccm Wasser wurde das ausgeschiedene Jod mit *n*/10-Na₂S₂O₃ titriert. Kontrollversuche mit vollständigen, aber nicht autoxydierten Ansätzen liefen zur Bestimmung der abzuziehenden Leerausscheidung an Jod mit.

Die Genauigkeit der Bestimmungen leidet durch die Bildung hartnäckiger voluminöser Eiweißsuspensionen beim Ansäuern und Ausäthern, durch Verluste beim Trocknen und bei der weiteren Aufarbeitung, so daß nur 80—90% des eingesetzten Substrats wiedergewonnen werden.

In Tab. 3 ist das Ergebnis zweier derartiger Peroxydbestimmungen wiedergegeben.

Tab. 3

	Linolsäure	Linolensäure
mMol Substrat	1,5	1,0
mMol O ₂ -Aufnahme	0,73	0,61
% O ₂ bezogen auf alle Doppelbindg.	24,3	20,3
% Substrat wiedergewonnen	87	80
Peroxyd gef. (in ccm <i>n</i> /10)	16,6*)	13,0**)
„ ber. aus O ₂ -Aufnahme	12,6	9,8
% Peroxyd d. Th.	132	133

*) nach Abzug des Leerwerts 2,9 ccm.

***) nach Abzug des Leerwerts 2,34 ccm.

Die erhaltenen Peroxydausbeuten liegen mit merkwürdiger Übereinstimmung sogar über 100%, obwohl ein Testversuch an dem zur Prüfung der Methode geeigneten *Di-oxyheptylperoxyd*^{11,12)} nur 92% ergeben hatte. Die Ursache der zu hohen Peroxydwerte soll noch eingehender geprüft werden, im vorliegenden Zusammenhang genügt jedoch der Nachweis einer praktisch quantitativen Peroxydbildung bei mäßigen Autoxydationsgraden, ähnlich wie bei der rein *chemisch* katalysierten Autoxydation der ungesättigten Fettsäuren¹¹⁾.

B. Jodzählbestimmungen. Um zu entscheiden, ob es sich bei den enzymatisch gebildeten Peroxyden um sekundäre (Brücken-) oder primäre Peroxyde (HC·O·OH) handelt, wurden an Autoxydationsprodukten einige Jodzahlen nach der Kaufmannschen Methode¹³⁾ bestimmt.

¹¹⁾ R. S. Morrell u. E. O. Phillips, J. Soc. Chem. Ind. 58, 159 (1939).

¹³⁾ H. P. Kaufmann, Studien auf d. Fettgebiet (Berlin 1935).

Die Aufarbeitung der enzymatischen Ansätze entsprach im wesentlichen der vorausgehend unter A. beschriebenen, mit dem Unterschied, daß der Ätherrückstand schließlich in 20 ccm Chloroform gelöst und mit dem Überschuß der methylalkoholischen Bromlösung versetzt wurde. Leerversuche mit nicht autoxydierter Fettsäure + Enzym wurden auch hier ausgeführt.

Das Resultat zweier Jodzahlbestimmungen enthält Tab. 4.

Tab. 4

	Linolsäure		Linolensäure	
mMol Substrat	0,8	0,8	0,6	0,6
mMol O ₂ -Aufnahme	0,34	—	0,38	—
% O ₂ bezogen auf alle Doppelbindgg.	21,25	—	21,0	—
% Substrat wiedergewonnen	99,7	99,7	83,1	86,2
ccm n/10-Br verbraucht	25,9	30,8	22,6	28,5
Jodzahl	145	176,5	205	249
% Jodzahlabnahme	17,3	—	16,2	—
% Jodzahlabnahme				
% O ₂ -Aufnahme × 100	81	—	77	—

Der Verlust von Doppelbindungen bleibt hier zwar — abweichend von der strikten Proportionalität zur O₂-Aufnahme bei der nichtenzymatischen Autoxydation^{1,11}) — um $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{5}$ hinter dem für ein *Brückenperoxyd* zu erwartenden zurück, doch muß die Bedeutung dieser Differenz erst noch durch weitere Versuche geklärt werden.

Grundsätzlich ist dazu zu bemerken, daß sich die Jodzahlabnahme bei geringen Autoxydationsgraden als Differenz zweier nicht sehr erheblich verschiedener Titrationswerte ergibt, in die jeweils noch die oben schon erwähnten Ungenauigkeiten des Aufarbeitungsverfahrens eingehen.

C. Hydrierung und Aufspaltung der Reaktionsprodukte mit Bleitetraacetat. Das angewandte Verfahren entsprach dem in der IV. Mitt. eingehend beschriebenen. Maßgebend war die Überlegung, daß ein *Brückenperoxyd* bei der katalytischen Hydrierung in ein Glykol und dieses bei der Oxydation nach Criegee in Aldehyd + Aldehydsäure übergehen sollte. Der wasserdampflichtige Aldehyd war als 2,4-Dinitrophenylhydrazon leicht zu fassen und mußte Auskunft über den Ort des primären O₂-Angriffs geben.

Die präparativen Ansätze entsprachen ungefähr dem 400fachen eines Normalansatzes, was den Einsatz von rund 10 g Linol- bzw. Linolensäure bedingte. Die Ansätze hatten folgende Zusammensetzung:

275 ccm Enzymlösung (QO₂ ca. 10000)
 360 ccm m/10-Na-Linol(en)at
 400 ccm m/5-Phosphatpuffer p_H 6,8
 965 ccm H₂O.

In Anbetracht der nachgewiesenen Enzymschädigung durch die Reaktionsprodukte wurde nur die Hälfte der Enzymlösung sofort zugesetzt, die andere Hälfte während des Versuchs zugetropt. Die Versuche wurden bei 21—22° in einer auf der Schüttelmaschine befindlichen 10-l-Flasche durchgeführt, die mit zwei Tropf-

trichtern (zur Enzym- und zur Substrat-Zugabe) versehen war und mit einem über Wasser abgeschlossenen Luftvolumen in Verbindung stand. Der O₂-Verbrauch konnte am Steigen des Wasserniveaus im Meßzylinder direkt abgelesen werden. Nach Erreichung einer geeigneten O₂-Aufnahme — 20—25% der zur Peroxydierung aller Doppelbindungen erforderlichen Menge — wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 ccm 2n-H₂SO₄ abgestoppt, die Reaktionslösung, aus der hierbei Fettsäure + Eiweiß ausgefallen waren, mehrmals mit Äther (insgesamt etwa 500 ccm) ausgeschüttelt, der Ätherextrakt i. V. eingedunstet und der Rückstand im Gesamtvolumen von 150 ccm Äther + 50 ccm Alkohol bei Gegenwart von 500 mg PtO₂ katalytisch hydriert.

Tab. 5 enthält quantitative Angaben über den Gang von Autoxydation und Hydrierung.

Tab. 5

	Linolsäure	Linolensäure
g Substrat	10,1	10,0
mMol Substrat	36,0	36,0
ccm O ₂	405	512
mMol O ₂	18,1	22,9
Autoxydationsgrad in %	25,2	21,2
ccm H ₂	1613	2080
mMol H ₂	72,1	92,8
Hydrierwert in %*)	100	86
g Hydrierungsprodukt	9,2	7,9
% d. Th.	86	72

*) 100% entsprechen der H₂-Kapazität des Ausgangsmaterials.

Wie ersichtlich, ist die Aufarbeitung auch hier nicht quantitativ. Da der Hauptverlust an Substanz wohl beim Ausäthern der eiweißhaltigen Reaktionslösungen (vgl. S. 228) erfolgt, liegen die Hydrierwerte vermutlich um etwa 15% über der Theorie; es muß also evtl. mit einer „Überreduktion“ primär gebildeten Glykols gerechnet werden.

Von den erhaltenen Hydrierungsprodukten wurden nach dem früher¹⁾ angegebenen Verfahren Säure- und Hydroxyl-Zahlen (SZ und OHZ) bestimmt. In Tab. 6 sind die gefundenen Absolut- und Prozentwerte beider Kennzahlen zusammengestellt.

Die theoretische SZ errechnet sich aus der SZ des Ausgangsmaterials unter Berücksichtigung der durch die O₂-Aufnahme bedingten Erhöhung des Molekulargewichts, die theoretische OHZ ist durch die Annahme, daß jede Peroxydgruppe bei der Reduktion 2 OH-Gruppen liefert, bestimmt.

Tab. 6

	Hydriertes Autoxydat der	
	Linolsäure	Linolensäure
SZ gef.	187,5	190
„ ber.	187	184,4
„ in % d. Th.	100	103
OHZ gef.	78	105
„ ber.	187	232
„ in % d. Th.	42	44

Während die Säurezahlen innerhalb der Fehlergrenzen der Theorie entsprechen, erreichen die OH-Zahlen kaum die Hälfte des theoretischen Werts. Dieses Ergebnis liegt auf der Linie des bei der nichtenzymatischen Reaktion gewonnenen, wo die OH-Zahlen der Hydrierungsprodukte im Durchschnitt 60 % der Theorie erreichten. Eine stichhaltige Erklärung des OH-Defizits kann zur Zeit noch nicht gegeben werden. [Vgl. die Diskussion in der vorausgehenden Mitt.¹⁾.]

Vor der präparativen Durchführung der Bleitetracetat-spaltung wurde der zu erwartende Verbrauch an Oxydationsmittel zunächst durch Titration der Hydrierungsprodukte mit n/10-PbAc₄ in Eisessig ermittelt¹⁾. Der Berechnung des prozentischen Umsatzes in Tab. 7 ist die Annahme quantitativer Peroxyd- bzw. Glykolbildung zugrundegelegt.

Tab. 7

	Hydriertes Autoxydat der	
	Linolsäure	Linolensäure
mg Substrat	281,6	240,9
Ursprüngl. Peroxydgeh. in m Mol (theor.)	0,469	0,502
OH-Gehalt in m Äqv. (theor.)	0,938	1,004
n/10-PbAc ₄ vorgelegt	10,03	10,03
n/10-PbAc ₄ verbraucht	1,50	1,04
Verbrauch in % d. Th.	16	10,4

Der nachgewiesene PbAc₄-Verbrauch ist also sehr gering, erheblich kleiner noch als im Falle der chemisch katalysierten Autoxydation, wo er bei ähnlichen Autoxydationsgraden in der Nähe von 30 % d. Th. lag. Nur etwa $\frac{1}{3}$ bis $\frac{1}{4}$ der nach Tab. 6 nachweisbaren OH-Gruppen liegt demnach in α -Glykolform vor.

Bei den präparativen Spaltungsversuchen, in denen jeweils etwa 7 g der hydrierten Autoxydationsprodukte eingesetzt wurden, kam die $1\frac{1}{2}$ fache Menge des in den beiden Vorversuchen festgestellten PbAc₄-Verbrauchs zur Anwendung. Das Ergebnis der beiden an Linol- und Linolensäure durchgeführten Aufarbeitungen (nach der Methode der IV. Mitt.) ist in Tab. 8 verzeichnet.

Qualitativ ergibt sich aus Tab. 8, daß sowohl bei Linol- wie bei Linolensäure die enzymatische Reaktion zuerst an Δ 12,13 einsetzt. Für den Fall der Linolsäure deckt sich dieses Ergebnis mit dem der nichtenzymatischen Oxydation¹⁾; dagegen wurde seinerzeit bei Linolensäure ein bevorzugter Angriff der 15,16-Doppelbindung festgestellt, der sich allerdings Δ 12, 13 sehr bald anschloß. Die Ölsäure-Doppelbindung (Δ 9, 10) erwies sich jedenfalls bisher stets als reaktionsträge. Es wird nachzuprüfen sein, ob die 12,13-Doppelbindung auch im isolierten Zustand reaktionsfähiger ist als die Doppelbindung der Ölsäure¹⁴⁾.

¹⁴⁾ Orientierende nichtenzymatische Autoxydationsversuche an Δ 12,13-Octadecensäure scheinen in diese Richtung zu weisen.

Tab. 8

	Linolsäure	Linolensäure
g Substrat	7,5	6,5
Autoxydationsgrad in %	25,2	21,2
Hydrierwert in %	>100 <116	>86 <119
g Roh-Hydraron*), (Schmp.)	0,134 (um 80°)	0,148 (um 60°)
g Hydraron, ger., gelb (Schmp.)	0,022 (102-103°)	0,014 (93-96°)
Hydraron-Ausbeute (Capronaldehyd) in %, bezogen auf		
a) hydriertes Autoxydat**).	3,8	3,9
b) dessen proz. OH-Zahl	9,1	8,9

Der Schmp. des *Capronaldehyd-dinitrophenylhydrazons* liegt bei 104°.

Die Analysen der in den beiden Versuchen erhaltenen gelben Hydrazone ergaben:

C 51,23	50,76	Ber. C 51,42	
H 5,73	5,55	H 5,74	C ₁₂ H ₁₆ O ₄ N ₄
N 20,04	20,61	N 19,99	

*) Mit *Hydraron* ist hier und im folgenden stets das *2,4-Dinitrophenylhydraron* gemeint.

**) Unter der Voraussetzung, daß nur *eine* Doppelbindung autoxydativ angegriffen wurde und pro angegriffene Doppelbindung *ein* Mol Aldehyd entsteht.

Im einzelnen ist zu den Versuchen noch zu bemerken: Die mit Wasserdampf übergehenden Aldehyde wurden jeweils in 2 Fraktionen aufgefangen. Die Hydraronfällung der zweiten Fraktion enthielt in beiden Fällen viel öliges Material. Zum Umkristallisieren der Rohhydrazone kamen nacheinander Benzol + Benzin, Amylalkohol + Essigester sowie zweimal Alkohol zur Anwendung.

In *quantitativer* Beziehung fallen auch bei der enzymatisch katalysierten Autoxydation wieder die sehr schlechten Aldehydausbeuten bei der PbAc₂-Spaltung auf. Die gefundenen Aldehydmengen entsprechen kaum 4 % des aufgenommenen Sauerstoffs, nur 9 % des in den hydrierten Autoxydationsprodukten enthaltenen Hydroxyls. Es bestätigt sich damit wieder die schon in der IV. Mitt. ausgesprochene Auffassung, daß die α -Glykolgruppierung in den genannten Produkten nur eine untergeordnete Rolle spielen kann. Trotz der sehr stark abweichenden Reaktionsbedingungen bei der chemisch und der enzymatisch katalysierten Autoxydation scheint der Reaktionsmechanismus in beiden Fällen weitgehend übereinzustimmen. Die Aufklärung der sich an die primäre Brückenperoxydbildung, die bisher allein hinsichtlich des Ausmaßes und Ortes im Molekül als experimentell sichergestellt betrachtet werden kann, anschließenden Folgereaktionen wird der Inhalt weiterer Mitteilungen sein.

Dem Reichsforschungsrat (Beauftragten für Fettforschung) danken wir für die finanzielle Förderung unserer Untersuchungen.

Berichtigungen

Bd. 557, S. 175, Anm.²⁾ ist zu streichen.

Bd. 557, S. 186, Z. 4 von oben: statt 210° lies 310°.

Bd. 557, S. 189, Z. 13 von unten muß heißen: alkali-löslich.

Bd. 557, S. 190, Z. 7 von unten lies: γ -Stellung.

Bd. 557, S. 190, Z. 12 von unten lies: 6-Stellung.

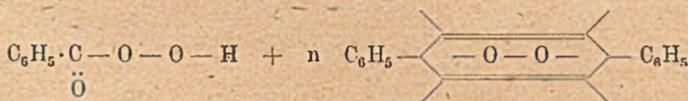
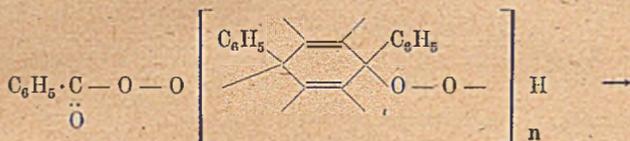
Bd. 557, S. 190, Z. 9 von unten

Bd. 557, S. 190, Z. 16 von oben

Bd. 557, S. 192, Z. 3, 9, 10 von unten

Rhodoporphyrin- γ -carbonsäure statt
Rhodoporphyrin

Bd. 558, S. 210: Die untenstehende Formelreihe ist zu ersetzen durch



Band 558 S. 233, Zeile 7 ist der Ausdruck „rechtsdrehendes“ zu streichen.

(Abgeschlossen am 8. Mai 1948)



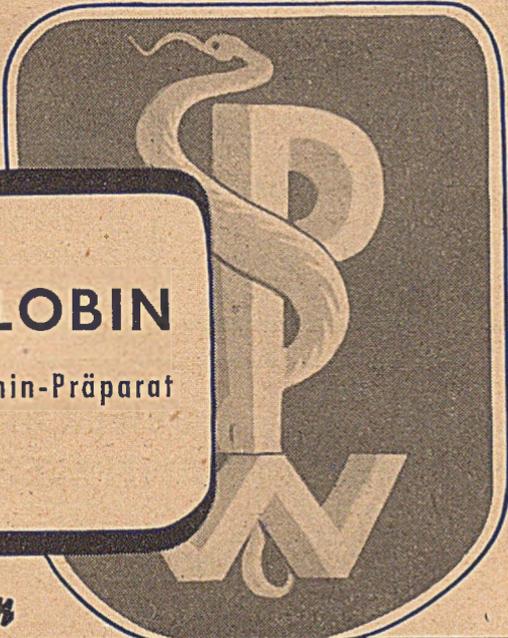
Nachdrucke von Zeitschriften

Es ist beabsichtigt, von den Kriegsjahrgängen der in Deutschland erschienenen chemischen Zeitschriften NACHDRUCKE herzustellen, um die entstandenen Lücken zu füllen.

Zur Feststellung des Bedarfs an diesen Nachdrucken bitten wir alle Interessenten, ihre Wünsche bis zum 1. Oktober 1948 der unterzeichneten Kekulé-Bibliothek unverbindlich anzugeben.

Die Kekulé-Bibliothek übernimmt hiermit lediglich die Vermittlung zwischen den Verlegern und den Interessenten, ohne jedoch für später eine Lieferungszusage geben zu können.

Kekulé-Bibliothek, Farbenfabriken Bayer, (22c) Leverkusen-Bayerwerk



CALCIOGLOBIN

Kalk- Eiweiß- Vitamin-Präparat

Philopharm

CHEM.-PHARM. FABRIK QUEDLINBURG

ROHRLEITUNGEN

HÄHN E, APPARATE
GEFASSE BIS 300 LITER INHALT
aus säurebeständigem Steinzeug

FRANZ GERHARDT
STEINZEUGFABRIK
SCHÖNEBECK/Elbe, Friedrichstr. 54—57

Emulgiermaschine

„ZENITH“

D. R. P. u. Auslandspat.

3 Typen von ca. 30 bis
600 Lit. Stundenleistung
zur Herstellung von Sei-
fen, Salben, Linimenten,
Aromen und Weich-
krem sowie Lebertran-
u. Lack-Emulsionen usw.

*Einfache Handhabung
Hohe Qualität*

Wilhelm Steinhorst

Leipzig N 22

Ehrensteinstr. 49

Neuer

pH-Tüpfelapparat

nach Prof. Dr. Tödt / Dr. Gollnow

Meßbereich 1—14 pH
Universalindikator 2—10 pH
mit 3 neuen Farbtafeln



Neue pH-Farbtafel

zur Prüfung der Bodenreaktion
und des Kalkbedarfs

Dr. G. Gollnow, Bln.-Charlotten-
burg 5, Hebbelstr. 20, sowie Bad
Segeberg/Holst. (24b), Kirchstr. 22

Soeben ist erschienen:

**GENERAL-REGISTER ZU
JUSTUS LIEBIGS ANNALEN DER CHEMIE**

Bände 501—550

Bearbeitet von Elisabeth Dane und Marlise
Dane † 81 Seiten geheftet RM 12.—

VERLAG CHEMIE G.m.b.H., (17a) Weinheim/Bergstr. und (1) Berlin-Friedenau

Asthma bronchiale

Zanedo

Pulver
 Inhalationsmittel
 Tabletten
 Tropfen

Graef

ENTW. GRAEF

ARZNEIMITTELFABRIK

MÜNCHEN BERLIN HAMBURG

FRANKFURT a/M

LORRACH/BADEN

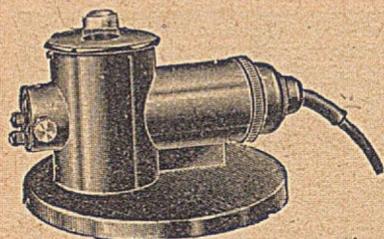


ZUSCHRIFTEN AN DIE WISSENSCHAFTLICHE ABTEILUNG

BERLIN-SCHÖNEBERG, GENESTR. 3

FISCHER

Lichtelektrisches Becherglas- Kolorimeter



mit Reagenzglas-Einsatz
kurzfristig lieferbar
ebenso Photoelemente, Luxmeter und Ultra-Relais

DR. B. LANGE



Spezialfabrik lichtelektrischer Zellen und Apparate · Berlin-Zehlendorf, Hermannstr. 14-18 · Tel. 848122

Säureschutzbau

seit 35 Jahren!

Wir bauen

Behälterauskleidungen jeder Art

Spezialität:

Säurefeste Fußböden, Wandbeläge
in bewährter Qualität und Ausführung

Liefern

Normalsteine, Normalplatten,
Formplatten, Spezial-Säurekitt,
Sekurit-Säurelack, Sekuritkitt

Kostenlose Beratung

Auf Wunsch Ingenieurbesuch

Friedrich Rößler

Fabrik säurefester Produkte
Bensheim/Bergstraße

Angebote von
Bibliotheken

Zeitschriften und Büchern
über

**CHEMIE, PHYSIK u.
GRENZGEBIETE**
sind stets erwünscht

Besonders gesucht werden:

Gmelins Handbuch der anorganischen Chemie, 7. und 8. Auflage
Beilsteins Handbuch der organischen Chemie, 3. und 4. Auflage
Hauptwerk und Ergänzungswerke
Ullmanns Enzyklopaedie der techn. Chemie, 1. und 2. Auflage
Auch einzelne Bände

VERLAG CHEMIE, GmbH.

Weinheim/Bergstr. u. Berlin-Friedenau
Hauptstr. 127 Kaiserallee 89

Es ist erschienen

OTTO HAHN

Künstliche neue Elemente

Vom Unwägbaren zum Wägbaren
(mit einer Einführung in die Geschichte der Kernspaltung)

Zu beziehen durch alle Buchhandlungen oder notfalls,
möglichst unter Einsendung von Packmaterial, vom

VERLAG CHEMIE, GMBH.

Weinheim/Bergstr. u. Berlin-Friedenau, Kaiserallee 89

52 Seiten

Preis RM. 2.50

Säureschutzbau

HOTTELET & CO. K.G.

BERLIN-ZEHLENDORF · MÖLLERPFAD 5 · FERNRUF 76 04 29

REAGENZ IEN

FEINCHEMIKALIEN

für Industrie und Forschung
Wissenschaftliche Präparate

in anerkannter Reinheit liefert, wenn auch
zur Zeit noch in beschränktem Umfang

Dr. Theodor Schuchardt G.m.b.H.

C h e m i s c h e F a b r i k
Zweigniederlassung Eisenach

Telefon: 1515

Telegramm-Adresse:
Schuchardt Eisenach

(15) EISENACH (THÜRINGEN)

(RUSSISCHE ZONE) Gaswerkstraße 30

ES ERSCHEINT WIEDER:

„Gewerblicher Rechtsschutz und Urheberrecht“

Herausgeber: Rechtsanwalt Dr. Eduard Reimer

Die Gebiete der Zeitschrift sind: Patent- und Gebrauchsmusterrecht, Wettbewerbs- und Warenzeichenrecht, Urheber- und Verlagsrecht. Durch Aufsätze, Mitteilungen der Gesetzgebung des In- und Auslandes, Wiedergabe von Entscheidungen wird fortlaufend über alles Wesentliche berichtet werden. Eine vordringliche Aufgabe der Zeitschrift ist es, zur Wiederherstellung und Festigung der Rechtsordnung und des Rechtsschutzes auf dem Gebiet des gewerblichen und geistigen Eigentums beizutragen. Insbesondere bedürfen augenblicklich die Fragen der Behandlung, die sich aus der Stilllegung des Patentamtes und der dadurch bedingten Unmöglichkeit, Schutz für neue Erfindungen und Warenzeichen zu erlangen, ergeben haben.

Die Zeitschrift erscheint zweimonatlich im Umfange von etwa 48 Seiten. Halbjahresbezugspreis RM 25.— zuzüglich Versandkosten — Die Hefte 1 und 2 liegen bereits vor.

VERLAG CHEMIE, G. m. b. H.,

Weinheim/Bergstr., Hauptstraße 127 und Berlin-Friedenau, Kaiserallee 89



Chemische Fabrik gegr. 1896 **Dr. Reininghaus**

Chemikalien und Präparate für
Untersuchungslaboratorien und
wissenschaftliche Zwecke

A p o l d a, Postfach 46. — Telefon 1147.

CHEMIKALIEN

für Pharmazie und Technik

REAGENZIEN

in höchster Reinheit

FIXANAL-SUBSTANZEN

für die Maßanalyse

RIEDEL-DE HAËN A.-G. • SEELZE bei HANNOVER

Vom Wasser

Ein Jahrbuch für Wasserchemie und Wasserreinigungstechnik

HERAUSGEGEBEN VON DR.-ING. WILHELM HUSMANN

XVI. Band 1943/1944 — 330 Seiten mit 47 Zahlentafeln und 93 Abbildungen

Von diesem Bande ist eine kleine Anzahl gut erhaltener
antiquarischer Exemplare verfügbar. Preis des broschierten
Werkes RM 14.— zuzüglich Porto und Versandkosten

Bestellungen werden erbeten an:

VERLAG CHEMIE, G.m.b.H., Abt. Antiquariat, Berlin-Friedenau, Kaiserallee 89