

Unter Berücksichtigung der Gesamtausbeute (79,7%) an Isomerengemisch ist die von Baer<sup>[4c]</sup> bei der Nitroäthan-Cyclisierung von 2-O-[(S)-Formyl-methoxy-methyl]-(*R*)-glycerinaldehyd beobachtete C<sup>5</sup>-Epimerisierung hier auszuschließen.

Eingegangen am 30. Juni 1966 [Z 277]

- [1] F. W. Lichtenhaller, Angew. Chem. 76, 84 (1964); Angew. Chem. internat. Edit. 3, 211 (1964).  
 [2] K. A. Watanabe, J. Beranek, H. A. Friedman u. J. J. Fox, J. org. Chemistry 30, 2735 (1965); J. Beranek, H. A. Friedman, K. A. Watanabe u. J. J. Fox, J. heterocyclic Chem. 2, 188 (1965); F. W. Lichtenhaller u. H. P. Albrecht, Chem. Ber. 99, 575 (1966).  
 [3] Bei aliphatischen [4a] und von Methylglykosiden abgeleiteten [4b, 4c] Dialdehyden sind Cyclisierungen mit Nitroäthan bereits durchgeführt worden.  
 [4a] F. W. Lichtenhaller, H. Leinert u. H. K. Yahya, Z. Naturforsch., im Druck.  
 [4b] S. W. Gunner, W. G. Overend u. N. R. Williams, Chem. and Ind. 1964, 1523.  
 [4c] H. H. Baer u. G. U. Rao, Liebigs Ann. Chem. 686, 210 (1965).  
 [5] Vgl. L. D. Hall, Tetrahedron Letters 1964, 1458.  
 [6] P. Emig, Diplomarbeit, Technische Hochschule Darmstadt, 1966; F. W. Lichtenhaller u. P. Emig, Tetrahedron Letters, im Druck.

### Isolierung von Protease-Inhibitoren<sup>[1]</sup>

Von Dr. H. Fritz, cand. chem. H. Schulte,  
 cand. med. M. Neudecker und Prof. Dr. Dr. E. Werle

Klinisch-Chemisches Institut an der Chirurgischen Klinik der  
 Universität München

Maleinsäureanhydrid-Äthylen-Copolymer (Molgew. 13500 bis 1350000; Zusammensetzung: 1:1, Typ: DX 840-21 EMA-M) reagiert in wässrigen Pufferlösungen (0,2 M Phosphatpuffer, pH = 7,5) mit den ε-Aminogruppen der Lysinreste von Trypsin (EC 3.4.4.4) [1 g EMA-M bindet ca. 5 g Trypsin], wobei in Gegenwart von Hexamethylendiamin als Vernetzungsmittel wasserunlösliches Trypsin-Maleinsäure-Äthylen-Copolymer entsteht<sup>[2]</sup>. Der noch enzymatisch wirksame Anteil (ca. 20 %) des an den unlöslichen Träger covalent fixierten Trypsins lässt sich durch Trypsin-Inhibitoren wie Kunitz-Inhibitor aus Pankreas oder Sojabohnen-Inhibitor hemmen<sup>[2]</sup>.

Wir verwendeten das Trypsin-Harz zur selektiven Adsorption von Trypsin-Inhibitoren aus nicht vorgereinigten Organextrakten im neutralen pH-Bereich. Nach dem Auswaschen aller Begleitsubstanzen mit 0,1 M Triäthanolaminpuffer + 0,1 M NaCl (pH = 7,8) aus dem Trypsin-Harz wurden die Inhibitoren mit 0,2 M KCl/HCl-Puffer eluiert. Die in der Tabelle angegebenen, von uns früher näher charakterisierten Trypsin-Inhibitoren<sup>[1, 3]</sup> konnten so aus mit 3-proz. Perchlorsäure eiweißfrei gemachten Organextrakten in einem Arbeitsgang rein und in hohen Ausbeuten isoliert werden.

Der Inhibitor aus Schweinepankreas wurde elektrophoretisch [Träger: Celluloseacetatfolien (275 × 310 mm) der Fa. Schleicher & Schüll; 0,01 M Boratpuffer (pH = 8), 400 Volt, 3 Std. Laufzeit, Elphorkammern der Fa. Bender & Hobein, München] in seine drei inhibitorisch aktiven Fraktionen getrennt<sup>[1, 3]</sup> und die Aminosäurezusammensetzung der mittleren Fraktion bestimmt<sup>[\*]</sup>: 4 Lys, 2 Arg, 4 Asp, 5 Thr, 6 Ser, 6 Glu, 5 Pro, 4 Gly, 1 Ala, 6 Cys1/2, 4 Val, 3 Ileu, 2 Leu, 2 Tyr. Auffallend ist das Fehlen der Aminosäuren Tryptophan, Methionin und Histidin. Außerdem wurden die wasserunlöslichen Enzym-Maleinsäure-Äthylen-Copolymere von Chymotrypsin (EC 3.4.4.5) und Kallikrein (EC 3.4.4.21) hergestellt. Aus Extraktten von Rinderpankreas wurde mit Hilfe des Chymotrypsin- oder Kallikrein-Harzes zuerst der Kunitz-Inhibitor und anschließend mit dem Trypsin-Harz der im Extrakt verbliebene spezifische Trypsin-Inhibitor isoliert. Die

Mit Hilfe eines Maleinsäureanhydrid-Äthylen-Copolymers isolierte Inhibitoren und Enzyme.

Copolymer plus	Isolierung von	reines Enzym bzw. Inhibitor Ausb. (%)
Trypsin (EC 3.4.4.4)	Trypsin-Inhibitor aus: Schweinepankreas Hundepankreas Rinderpankreas Mäusesamenblasen	90 82 95 75
Chymotrypsin (EC 3.4.4.5)	Kunitz-Inhibitor aus: Rinderpankreas	90
Kallikrein (EC 3.4.4.21)	Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus: Rinderorganen	70
Trypsin-Kallikrein-Inhibitor Trasylol®	Trypsin Chymotrypsin	95 90

Trennung der beiden in ihrer Molekülgröße [Kunitz-Inhibitor: M = 6513; spez. Trypsin-Inhibitor: M ≈ 6000, nach Aminosäurezusammensetzung; M = 6800 nach<sup>[4]</sup> Molekulsiebmethode nach Andrews] ähnlichen Inhibitoren war quantitativ.

Das Verfahren haben wir auch zur Reinigung von Enzymen verwendet: Der an das Copolymer fixierte Kallikrein-Inhibitor<sup>[5]</sup> adsorbiert aus proteinhaltigen Lösungen spezifisch Trypsin oder Chymotrypsin oder Kallikrein. Trypsin und Chymotrypsin ließen sich von dem Kallikrein-Inhibitor-Harz in 90- bis 95-proz. Ausbeute mit sauren Puffer-Lösungen, z.B. 0,2 M KCl/HCl-Puffer (pH = 2), eluieren.

Die Enzym- und Inhibitor-Maleinsäure-Äthylen-Copolymere verlieren auch bei häufiger Verwendung (erprobt bis zu 60 mal) zur Isolierung von Inhibitoren bzw. Enzymen ihr spezifisches Bindungsvermögen nicht, sofern man bei 4 bis 8 °C arbeitet.

Eingegangen am 23. Juni 1966 [Z 275]

- [1] 3. Mittlg. — 2. Mittlg: H. Fritz, F. Woitinas u. E. Werle, Z. physiol. Chem. 345, 168 (1966).  
 [2] Y. Levin, M. Pecht, L. Goldstein u. E. Katchalski, Biochemistry 3, 1905 (1964).  
 [3] H. Fritz, G. Hartwich u. E. Werle, Z. physiol. Chem. 345, 150 (1966).  
 [\*] Wir danken Herrn Prof. Dr. G. Braunitzer, Max-Planck-Institut für Biochemie, München, für die Analyse.  
 [4] H. Fritz, I. Trautschold u. E. Werle, Z. physiol. Chem. 342, 253 (1965).  
 [5] R. Vogel, I. Trautschold u. E. Werle: Natürliche Proteinase-Inhibitoren. Thieme, Stuttgart 1966, im Druck; dieser Inhibitor ist mit dem Kunitz-Inhibitor identisch.

### Metabolismus des Thiodans® in Insekten

Von Dr. K. Ballschmiter und Priv.-Doz. Dr. G. Tölg<sup>[1]</sup>

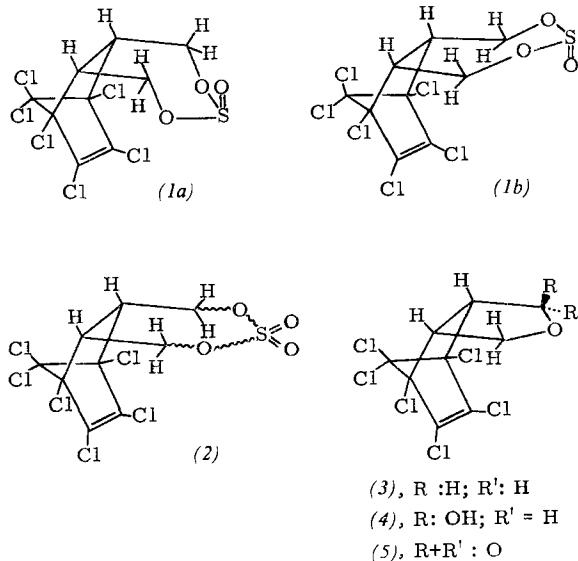
Institut für anorganische Chemie und Kernchemie der  
 Universität Mainz

Bisher wurde bei Hausfliegen (*Musca domestica*) als Metabolit des Insektizids Thiodan®, 1,2,3,4,7,7-Hexachlor-bicyclo[2.2.1]hept-2-en-5,6-bismethylen-sulfit, (1a) + (1b), nur das Sulfat (2)<sup>[2]</sup> identifiziert<sup>[3]</sup>.

Wir untersuchten den Metabolismus in männlichen Imagines der Wanderheuschrecke (*Pachytillus migratorius migratoroides*) und fanden, daß Thiodan, (1a) + (1b), nach peroraler, kutaner und subkutaner Applikation (DL<sub>50</sub> = 5–10 µg/g<sup>[3]</sup>) teils unverändert, teils verändert mit den Faeces ausgeschieden wird.

Die Metabolite (2) bis (5) konnten<sup>[4]</sup> auf folgendem Weg identifiziert werden: Die nach Annahme von Hydrolyse, Oxidation und Konjugation als Entgiftungsreaktionen für das

Thiodan theoretisch in Frage kommenden Umwandlungsprodukte standen zum größten Teil zur Verfügung oder wurden synthetisiert. Die chromatographischen Daten der Metabolite wurden mit denen der synthetisierten Verbindungen verglichen. Vergleichssubstanz und Metabolit wurden als identisch angesehen, wenn bei beiden nach dünnenschichtchromatographischer Vortrennung bei der anschließenden gaschromatographischen Trennung der von der Dünnschicht extrahierten Verbindungen die relativen Retentionszeiten (siehe Tab.) auf Säulen mit unterschiedlich polarer Trennflüssigkeit übereinstimmten.



Bei (4) ist die Konfiguration der Hydroxygruppe nicht gesichert.

	Fp (°C)	Lit.	Relative Retentionszeiten		
			Säule 1	Säule 2	Säule 3
(1a)	108–110	[2, 5]	1	1	1
(1b)	209–211	[2, 5]	2,16	2,70	1,34
(2)	180–181	[2]	4,83	6,02	1,70
(3)	224–226	[2, 5]	0,34	0,47	0,43
(4)	234–235	[4]	0,73	1,09	0,67
(5)	260–263	[6]	1,71	2,31	0,71

Säule 1: 2 % Fluorsilikikonkautschuk (QF — 1) auf Anakrom ABS; 110–120 mesh; Glas Duran 50; inn. Durchm. 2,5 mm, Länge 1 m. 180 °C; Retentionszeit (1a): 3,82 min.

Säule 2: 2 % Nitrilsilikikonkautschuk (XE — 60) auf Anakrom ABS; 110–120 mesh; Glas Duran 50; inn. Durchm. 2,5 mm, Länge 1 m. 210 °C; Retentionszeit (1a): 2,92 min.

Säule 3: 5 % Methylsilikonkautschuk (SE — 30) auf Diatoport PAW; 60–80 mesh; Glas Duran 50; inn. Durchm. 4 mm, Länge 1 m. 225 °C; Retentionszeit (1a): 13,1 min.

Bei der Dünnschichtchromatographie auf Aluminiumoxid H(Merck)- und Silikagel HR(Merck)-Platten wurden die Substanzen (1) bis (5) mit Fluoreszenzindikatoren<sup>[7]</sup> wie N,N,N',N'-Tetraäthyl-benzidin, N,N-Dimethylamino-fluoranthen, N-Methyl-carbazol und 3-Aminopyren im Nanogrammbereich nachgewiesen. Der Nachweis nach gaschromatographischer Trennung gelang mit Elektroneneinfang-Detektoren<sup>[8]</sup> mit Picogrammengen, so daß die Versuche mit einzelnen Imagines durchgeführt werden konnten. (F + M Scientific Gaschromatograph Modell 700 mit Elektroneneinfang-Detektor; Trägergas: Argon + 5 % Methan; Varian-Aerograph Modell 205 B mit zwei Elektroneneinfang-Detektoren; Trägergas: Stickstoff, nachgereinigt.)

Eingegangen am 10. Juni 1966,  
ergänzt am 30. Juni 1966 [Z 274]

[1] Die Deutsche Forschungsgemeinschaft, der Verband der chemischen Industrie und die Farbwerke Hoechst AG. unterstützten die Arbeit durch Sachbeihilfen. Der Studienstiftung des deutschen Volkes sei für ein Promotionsstipendium (K. B.) gedankt.

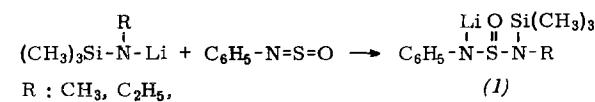
- [2] S. E. Forman, A. J. Durbetaki, M. V. Cohen u. R. A. Olofson, J. org. Chemistry 30, 169 (1965).
- [3] W. W. Barnes u. G. Ware, J. econ. Entomol. 58, 286 (1965).
- [4] K. Ballschmiter, Dissertation, Universität Mainz, 1966.
- [5] H. Frensch u. H. Goebel, DBP 960989 u. 1015797 (1957).
- [6] R. Riemschneider u. J. C. Hilscher, Z. Naturforsch. 15b, 809 (1960).
- [7] K. Ballschmiter u. G. Tölg, Z. analyt. Chem. 215, 305 (1966).
- [8] S. J. Clark, Residue Reviews 5, 32 (1964).

## N-Trimethylsilyl-substituierte Schwefigsäure-diamide und -imide sowie N-Alkyl-N'-phenyl-schwefeldiimide

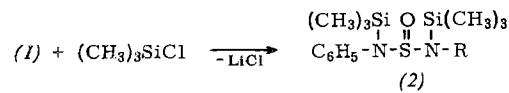
Von Dr. O. J. Scherer und Dipl.-Chem. P. Hornig

Institut für Anorganische Chemie der Universität Würzburg

Lithium(trimethylsilyl)alkylamide<sup>[1]</sup> addieren sich an N-Phenyl-sulfinylimin (Molverh. 1:1) in Petroläther unter Eiskühlung zu luftempfindlichen N-Lithium-N'-trimethylsilyl-schwefigsäurediamiden (1) (Ausb. ca. 70 %), die in Petroläther unlöslich, in Diäthyläther dagegen ausgezeichnet löslich sind.

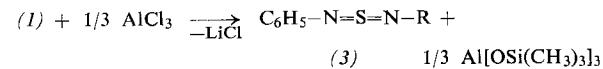


Die Verbindungen (1) reagieren u.a. mit (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>SnCl und AlCl<sub>3</sub>. Ihre Umsetzung mit Trimethylchlorsilan (Molverh. 1:1) in Petroläther/Äther-Lösung N-Alkyl-N'-phenyl-schwefeldiimide (3) [(3a), R: CH<sub>3</sub>, K<sub>p</sub> = 52–54 °C/0,1 Torr; (3b), R: C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, K<sub>p</sub> = 65–67 °C/0,1 Torr] als orange Flüssigkeiten,



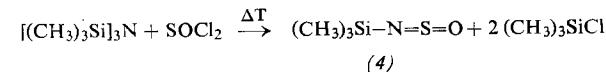
Ausbeute die Schwefigsäurediamide (2) [(2a) R: CH<sub>3</sub>, F<sub>p</sub> = 27–29 °C; (2b), R: C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, F<sub>p</sub> = 25–27 °C], deren <sup>1</sup>H-NMR-Signale die berechneten Flächenverhältnisse aufweisen [(2a): ber. 9:9:5:3, gef. 9:9:5,2:2,8; (2b): ber. 9:9:5:5, gef. 9:9:5,1:4,9].

Versuche, (2) zu destillieren, führten oberhalb 100 °C zur Abspaltung von Hexamethyldisiloxan. Die dabei gebildeten Schwefeldiimide (3) lassen sich, nur leicht verunreinigt, isolieren und <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopisch nachweisen. In ca. 50-proz. Ausbeute erhält man aus (1) und AlCl<sub>3</sub> (Molverh. 3:1) in Petroläther/Äther-Lösung N-Alkyl-N'-phenyl-schwefeldiimide (3) [(3a), R: CH<sub>3</sub>, K<sub>p</sub> = 52–54 °C/0,1 Torr; (3b), R: C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, K<sub>p</sub> = 65–67 °C/0,1 Torr] als orange Flüssigkeiten,



die im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum nur die erwarteten Signale vom vorausberechneten Flächenverhältnis aufweisen [(3a):  $\tau = 6,44$  (CH<sub>3</sub>),  $\tau = 2,93$  (m) (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), Flächenverh. 5:3; (3b):  $\tau = 8,70$  (t) u. 6,08 (q) (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>),  $\tau = 2,88$  (m) (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), Flächenverh. 1:1].

Als ersten Vertreter N-silylierter Sulfinylimine (Schwefigsäureimide) synthetisierten wir lösungsmittelfrei aus Trimethylsilylamin und Thionylchlorid (Molverh. 1:1) unter



AlCl<sub>3</sub>-Katalyse bei ca. 70 °C N-Trimethylsilyl-sulfinylimin (4) in ca. 50-proz. Ausbeute. (4) ist eine farblose, hydrolyseempfindliche Flüssigkeit (K<sub>p</sub> = 108–110 °C/760 Torr; F<sub>p</sub>