

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 auszu-schließen.

Eingegangen am 30. Juni 1966 [Z 277]

[1] F. W. Lichtenthaler, 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. Lichtenthaler 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. Lichtenthaler, 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. Lichtenthaler u. P. Emig, Tetrahedron Letters, im Druck.

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

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

Klinisch-Chemisches Institut an der Chirurgischen Klinik der Universität München

Maleinsäureanhydrid-Äthylen-Copolymer (Molgew. 13 500 bis 135 000; 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. 5g Trypsin], wobei in Gegenwart von Hexamethyldiamin 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 (\*): 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 Extrakten 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> Molekularsiebmethode 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-sulfid, (1a) + (1b), nur das Sulfat (2)<sup>[2]</sup> identifiziert<sup>[3]</sup>.

Wir untersuchten den Metabolismus in männlichen Imagines der Wanderheuschrecke (*Pachytillus migratorius migratorius*) 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