

**52. Eugen Bamann und Paul Laeverenz:**

Über den Einfluß von optisch aktiven Fremdstoffen auf die Konfigurations-Spezifität der Leber-Esterase verschiedener Tiere. (Dritte<sup>1)</sup> Mitteilung „Über asymmetrische Ester-Hydrolyse durch Enzyme“ in der von R. Willstätter, R. Kuhn und E. Bamann begonnenen Untersuchungsreihe.)

[Aus d. Chem. Laborat. d. Bayer. Akademie d. Wissensch. in München.]  
(Eingegangen am 14. Dezember 1929.)

Das Wirkungsvermögen der fett- und ester-spaltenden Enzyme ist von Begleitstoffen, von aktivierenden und hemmenden, in ungemein hohem Maße abhängig. Diese Erfahrung spricht schon aus älteren Untersuchungen. Genauere Kenntnis über die Art dieser Stoffe und ihre Bedeutung für den Reaktions-Mechanismus verdankt man den systematischen Untersuchungen R. Willstätters und seiner Mitarbeiter. Die Berücksichtigung der natürlichen Begleitsubstanzen führte zunächst zu wertvollen, neuartigen Vorstellungen über das lipatische Reaktions-System<sup>2)</sup> und zu Bestimmungs-Methoden<sup>3)</sup>, die die Ausschaltung der wechselnden Einflüsse der Begleitstoffe ermöglichten. Untersuchungen über das Enzym des Magens<sup>4)</sup> erbrachten den wichtigen Befund, daß sogar für die pH-Abhängigkeit des lipatischen Wirkungsvermögens, die bisher als ein Charakteristikum des Enzyms selbst galt, Begleitstoffe mitverantwortlich sind. Auch das Verhalten gegenüber Alkaloiden und anderen Giften, nämlich Empfindlichkeit oder Resistenz, das P. Rona<sup>5)</sup> mit seinen Mitarbeitern eingehend untersuchte und als eine Eigenschaft des Enzyms ansah, muß als wesentlich mitbedingt durch Begleitstoffe bezeichnet werden<sup>6)</sup>.

Nur bei einer Erscheinung konnte bis heute eine Abhängigkeit von der Umgebung des Enzyms noch nicht gefunden werden, bei der Konfigurations-Spezifität. Diese Frage haben R. Willstätter, E. Bamann und J. Waldschmidt-Graser<sup>7)</sup> an den Beispielen der Pankreas- und der Magen-Lipase, sowie der Leber-Esterase, und zwar hauptsächlich an den Enzymen einer Tierart, des Schweines, geprüft. „Die Einwirkung

<sup>1)</sup> R. Willstätter, R. Kuhn u. E. Bamann, Über asymmetrische Ester-Hydrolyse durch Enzyme (I. Mitteil.), B. **61**, 886 [1928]; E. Bamann, Über die Konfigurations-Spezifität der Leber-Esterase verschiedener Tiere und ihre Abhängigkeit von der Substrat-Konzentration (II. Mitteil.), B. **62**, 1538 [1929].

<sup>2)</sup> R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz u. Fr. Memmen, Ztschr. physiol. Chem. **125**, 93 [1923], u. zw. S. 99ff.; die Vorstellungen über die Kombinationswirkung mehrerer Aktivatoren sind in der neueren (auch referierenden) Literatur über die Katalyse unberücksichtigt geblieben.

<sup>3)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **125**, 93 [1923], **129**, 1 [1923], **188**, 229 [1924].

<sup>4)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **188**, 247 [1924], **140**, 203 [1924]; vergl. auch: K. Gyotoku, Biochem. Ztschr. **198**, 18 [1927/28].

<sup>5)</sup> Biochem. Ztschr. **111**, 166 [1920], **118**, 213 [1921], **180**, 225 [1921], **134**, 108 [1922/23], **184**, 118 [1922/23], **141**, 222 [1923], **146**, 144 [1924], **163**, 197 [1925], **167**, 171 [1926], **181**, 49 [1927]; vergl. a. J. A. Smorodinew, Biochem. Ztschr. **197**, 160 [1928].

<sup>6)</sup> R. Willstätter u. Fr. Memmen, Ztschr. physiol. Chem. **188**, 216 [1924], u. zw. S. 241ff.; K. Gyotoku, Proceed. Imp. Akad. Tokyo **8**, 368 [1927]; Biochem. Ztschr. **198**, 39 [1927/28]; P. Rona u. R. Ammon, Biochem. Ztschr. **181**, 49 [1927], u. zw. S. 75.

<sup>7)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **178**, 155 [1928]; vergl. auch P. Rona u. R. Itelsohn-Schechter, Biochem. Ztschr. **197**, 482 [1928], u. zw. S. 485.

der genannten drei Esterasen in rohen und reinsten Zuständen auf Mandelsäure- und Phenyl-chlor-essigsäure-ester hat zu dem Ergebnis geführt, daß sich in keinem Fall bei der Steigerung des enzymatischen Reinheitsgrades der Sinn des stereochemischen Auswählens ändert.“

Bei der großen Bedeutung, die diesem Problem zunächst für die Erforschung der fettpaltenden Enzyme, darüber hinaus aber für die Analyse der asymmetrischen Wirkungen von Enzymen überhaupt, deren wir heute eine ganze Reihe kennen, zukommt, sind wir erneut an die Frage herangetreten, ob und inwieweit das optische Auswählen der Esterasen durch Stoffe nicht-enzymatischer Natur bedingt sein kann.

Auf Grund der eindrucksvollen Versuche von G. Bredig und K. Fajans<sup>8)</sup>, die die Spaltung der Camphocarbonsäure durch Zusatz kleiner Mengen Chinin bzw. Chinidin so leiten konnten, daß im einen Fall rascher der *l*-Campher, im anderen der *d*-Campher gebildet wird, sowie unserer Erfahrungen über den Reaktions-Mechanismus asymmetrischer Ester-Hydrolyse haben wir die Frage in der Form zum Ziele unserer Untersuchung gemacht, ob und inwieweit das optische Auswählungsvermögen der Leber-Esterase durch Zusätze von Fremdstoffen beeinflußbar ist. Wir knüpfen dabei an Versuche von P. Rona und R. Ammon<sup>9)</sup> an, die den Einfluß von Chinin und Chinidin auf das auswählende Verhalten der Schweineleber-Lipase an *rac.* Mandelsäure-methylester prüften, jedoch die Alkalioide in den untersuchten drei Fällen in dieser Hinsicht belanglos fanden.

Als Zusätze zu den Enzym-Lösungen wählten wir Fremdstoffe, die mit einer einzigen Ausnahme, dem Atoxyl, der Klasse der natürlichen Pflanzenbasen zugehörend, optisch aktiv waren.

Bei der Leber-Esterase des Schweines ist es uns in einer Reihe von Versuchen mit verschiedenen Alkaloiden und unter verschiedenen Reaktions-Bedingungen nicht gelungen, einen Einfluß auf das optische Auswählen auszuüben, trotzdem die Geschwindigkeit der Racemat-Spaltung mehr oder weniger stark herabgemindert war. Dagegen erfüllten sich unsere Erwartungen bei den Esterasen der Menschen-Leber und der Kaninchen-Leber. Ein Zusatz von Alkaloiden zur Enzym- bzw. Reaktions-Lösung ändert das Verhältnis der Umsätze der antipodischen Komponenten des Racemates, in vielen Fällen sogar so, daß es sich umkehrt. Eine Änderung der Spaltungs-Geschwindigkeit des Racemates braucht damit nicht verbunden zu sein; doch beobachtet man häufig eine Beschleunigung oder eine Hemmung derselben (Tabelle I).

Der Einfluß auf das optische Auswählen erweist sich abhängig vom Alkaloid, von seiner Menge, von der Wasserstoff-Ionen- und von der Substrat-Konzentration des Versuchs-Ansatzes.

Unsere Befunde regen zu neuer Arbeit auf dem Gebiete des biochemischen Asymmetrie-Problems an. Im Mittelpunkt steht die physiologisch und chemisch gleich wichtige Frage, ob die Enzyme „noch im reinsten Zustand, der zurzeit erreichbar ist, ihre stereochemische Eigenart bewahren<sup>10)</sup>“. Vielleicht ist ihre Beantwortung ein noch fernes Ziel, das zuvor der Lösung anderer Teilfragen bedarf.

<sup>8)</sup> B. 41, 752 [1908]; K. Fajans, Ztschr. physikal. Chem. 73, 25 [1910].

<sup>9)</sup> Biochem. Ztschr. 181, 49 [1927], u. zw. S. 67.

<sup>10)</sup> R. Willstätter, E. Bamann u. J. Waldschmidt-Graser, Ztschr. physiol. Chem. 173, 155 [1928].

Tabelle I.

Einfluß von Alkaloiden auf die stereochemische Spezifität der Leber-Esterase des Menschen und des Kaninchens.

(Vers.-Ansatz von 50 ccm, enthaltend in Vers. 1—3 0.25 g, in Vers. 4—6 0.50 g  
rac. Mandelsäure-äthylester u. 2 g Phosphat-Puffer pH = 7.)

Vers.	Leber-Esterase von:	Zusätze: (100 mg)	Reakt.-Dauer: (Stdn.)	Spalt. (Proz.)	Hemmung d. Reakt.-Geschw. (Proz.)	Beschleunigung d. Reakt.-Geschw. (Proz.)	$[\alpha]_D$ der Mandelsäure
1	Menschen..	—	3	20.0	—	—	+ 7.9°
2	"	Strychnin	1½	19.5	—	95	-80.1°
3	"	Cinchonin	2¼	18.5	—	23	-27.3°
4	Kaninchen.	—	3	20.2	—	—	+ 1.2°
5	"	Strychnin	3	18.6	8	—	+20.3°
6	"	Chinidin	1¾	18.5	80	—	+14.2°

### Beschreibung der Versuche.

#### I. Enzym-Material.

Als Enzym-Lösungen verwendeten wir Auszüge aus Trockenpräparaten, die wir aus der frischen Leber durch Aceton- und Aceton-Äther-Behandlung nach der Vorschrift der II.<sup>11)</sup> und XVII.<sup>12)</sup> Abhandlung über Pankreas-Enzyme gewannen. Es diente dazu stets die Leber nur eines einzigen Tieres, und zwar bei den Schlachttieren unmittelbar nach der Tötung entnommen, während die Menschenleber erst 12—24 Stdn. nach dem Tode zugänglich war. In der Literatur finden sich Angaben, wonach sich Präparate in nicht-gealtertem und gealtertem Zustand reaktionskinetisch verschieden verhielten; wir versehen nunmehr unsere Präparate unter Beifügung des Tages ihrer Darstellung mit Kenn-Nummern, wodurch eine Übersicht über das in den Arbeiten angewandte Enzym-Material ermöglicht wird.

Schweineleber 1 (15. VI. 1927), Schweineleber 2 (18. VI. 1929), Kaninchenleber 1 (23. V. 1928), Kaninchenleber 2 (23. V. 1928), Menschenleber 1 (12. VI. 1928), Menschenleber 2 (4. II. 1929), Menschenleber 3 (28. V. 1929).

Schweineleber 1 war das Enzym-Material der I. Mitteilung dieser Reihe, mit Lösungen aus Kaninchenleber 1 und Menschenleber 1 wurden die entsprechenden Messungen der II. Mitteilung ausgeführt, und die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung wurden zum großen Teil mit Auszügen aus denselben, also monatelang gealterten Präparaten, gewonnen.

Die Enzym-Lösungen stellten wir durch 1-stdg. Extrahieren mit  $n_{40}$ -Ammoniak (50 ccm : 1 g Trockenpräparat) dar. Nach Abscheiden eines unwirksamen Niederschlages durch Zugabe verd. Essigsäure und seiner Entfernung in der Zentrifuge wurden die Lösungen 4 Tage in Hammel-Blinddärmen gegen fließendes, destilliertes Wasser dialysiert. Wir bestimmten

<sup>11)</sup> R. Willstätter u. E. Waldschmidt-Leitz, Ztschr. physiol. Chem. **125**, 132 [1923].

<sup>12)</sup> R. Willstätter, E. Bamann u. J. Waldschmidt-Graser, Ztschr. physiol. Chem. **178**, 155 [1928].

alsdann ihre Wirksamkeit gegen Methylbutyrat<sup>13)</sup> und bewahrten sie ohne Einbuße an Wirkungsvermögen im Eisschrank unter Toluol auf; sie enthalten das Enzym in einem nur 15–20-fach höheren Reinheitsgrad als die Trockenpräparate. Das Enzym der Schweineleber 2 fand in einer Versuchsreihe auch in Form des Preßsaftes, in einer anderen in Form eines Glycerin-Auszuges aus der frischen Leber Anwendung.

## 2. Ausführung der Versuche.

Für die Versuche, die auswählende Wirkung der Esterasen gegenüber den spiegelbildlichen Estern im Racemat kennen zu lernen, haben wir sorgfältig gereinigten, „induktions-“<sup>14)</sup>freien Mandelsäure-äthylester, vollkommen neutral reagierend, verwendet. Die Messungen wurden bei 25° in Anwesenheit von Phosphat-Puffer,  $p_H = 7.0$ , ausgeführt. Die Mengen Ester, Phosphat und gelegentlicher Zusätze, enthalten in 50 ccm Reaktionsgemisch, sind in den einzelnen Tabellen angegeben. In den Versuchen mit Zusätzen wurde so verfahren, daß die Fremdstoffe gelöst (bei Alkaloiden die neutralisierte Lösung der schwefelsauren Salze) zuerst in die den Puffer enthaltenden Enzym-Lösungen gegeben wurden. Nach 2 Min. erfolgte dann die Zugabe des auf dem Wasserbade vorsichtig verflüssigten Mandelsäure-esters. Längere Einwirkungszeit der Fremdstoffe auf das Enzym (bis 30 Min.) änderte in einigen Beispielen das Versuchs-Ergebnis in keiner Weise. In Ansätzen, die noch ungelösten Ester enthielten, wurde durch gleichmäßiges Schütteln für eine ständige Sättigung der Lösung und feine Verteilung des flüssigen Esters Sorge getragen. Das Volumen der Analysenproben betrug meist 50 ccm, bisweilen ein Vielfaches davon: 100 oder 250 ccm, in einigen Beispielen (Schweineleber) sogar 4000 ccm; das war in Versuchen bei geringer Substrat-Konzentration zur Vermeidung allzu kleiner Drehungswinkel notwendig.

Die Analyse der Versuchslösungen führten wir wie in früheren Arbeiten durch: Wir entfernten zunächst nach Einstellung schwach soda-alkalischer Reaktion durch Ausschütteln mit Äther den unverseiften Ester und entzogen dann der mit Schwefelsäure stark angesäuerten und mit Ammoniumsulfat gesättigten Lösung durch wiederholtes Ausäthern die Mandelsäure. Die Auszüge wurden gewaschen, getrocknet und abgedampft, die hinterbleibende Säure in Wasser zu 10 ccm gelöst und nach Bestimmung des Drehungswinkels im 2-dm-Rohr mit  $n_{D}^{25}$ -Lauge titriert. Besonderer Sorgfalt bedurfte die Aufarbeitung der Versuche mit Alkaloid-Zusätzen. Hier trugen wir den Löslichkeits-Verhältnissen des Alkaloids sowohl durch die Wahl wie die Menge des Extraktionsmittels (Äther, Chloroform) von Fall zu Fall Rechnung. Erst wenn die Ausschüttelungs-Proben aus alkalischer Lösung frei von Alkaloiden waren — das traf stets für die vierte Probe zu — wurde diese Operation beendet.

Wir überzeugten uns auch in Blindversuchen ohne Substrat, daß keiner der angewandten Fremdstoffe mit dem Enzym so reagierte, daß der Titrations- oder optische Wert der Mandelsäure hätte gefälscht werden können.

<sup>13)</sup> Die Enzym-Menge (Lipase-Einheiten der Tabellen) ist ermittelt unter den in der II. Mitteil. (S. 1541) angegebenen Bedingungen. Über den Mengenvergleich von Esterasen verschiedener Herkunft siehe: E. Bamann u. M. Schmeller, Ztschr. physiol. Chem. 188, 149 [1929].

<sup>14)</sup> Über die Erscheinung der „Induktion“ vergl. R. Willstätter, R. Kuhn, O. Lind u. Fr. Memmen, Ztschr. physiol. Chem. 167, 303 [1927].

### 3. Messungs-Ergebnisse.

#### Einfluß von Fremdstoffen und Reaktions-Bedingungen auf das optische Auswählen der Schweineleber-Esterase.

In den Untersuchungen über die stereochemische Spezifität war die Leber des Schweines — wohl wegen ihrer leichten Zugänglichkeit — ein besonders bevorzugtes Esterase-Material. Mit diesem Enzym sind auch zwei besondere Daten in der Erforschung der Konfigurations-Spezifität verbunden: Ihre Entdeckung<sup>15)</sup> und die Aufklärung des ihr zugrunde liegenden Reaktions-Mechanismus<sup>16)</sup>. Auch für die in dieser Untersuchung behandelte Frage, ob und wie weit das optische Auswählen der Esterasen durch Variation der Reaktions-Bedingungen und insbesondere durch Zusätze von Fremdstoffen zu beeinflussen ist, haben wir in erster Linie das Enzym der Schweineleber herangezogen. Dabei sind wir zu dem Ergebnis gekommen, daß das Auswählungsvermögen bei mäßig hoher Racemat-Konzentration unabhängig ist von der Art der Enzym-Darstellung und unabhängig von der Reaktions-Temperatur. Weder im Preßsaft oder im Glycerin-Auszug aus frischer Leber noch in Auszügen aus derselben, jedoch Aceton-Äther-getrockneten Leber verhielt sich das Enzym bezüglich des Auswählens verschieden. Dieses Resultat steht im Einklang mit den Ergebnissen der Untersuchung von R. Willstätter, E. Bamann und J. Waldschmidt-Graser, die das Auswählungsvermögen der Schweineleber-Esterase unabhängig vom Reinheitsgrad des Enzyms fanden. Die Variation der Reaktions-Temperatur im Intervall von 12—40° änderte an den Ergebnissen nichts.

Weiterhin ist es auch durch Zusatz von Fremdstoffen nicht gelungen, das optische Auswählen in dem üblichen Gebiet mittlerer Substratkonzentration (0.25 g Ester : 50 ccm)<sup>17)</sup> merklich zu beeinflussen, obgleich die Umsatzgeschwindigkeit der Racemat-Spaltung durch die verschiedenen Zusätze mehr oder weniger herabgesetzt wurde. Wir haben, wie Tabelle 3 zeigt, eine Reihe von natürlichen Pflanzenbasen, ferner Atoxyl bei dieser Substratkonzentration geprüft. In den Versuchen 10—13 und 18—21 erfolgte die Racemat-Spaltung in verdünnten und in sehr verdünnten Lösungen: 0.2 g Ester : 2000 ccm bzw. 0.1 g Ester : 4000 ccm. Wenngleich diese Versuche von vornherein größere Konzessionen hinsichtlich der Fehlergrenze verlangen als die Analyse von 50 ccm Reaktionsgemisch, so konnte auf sie doch nicht verzichtet werden, da, wie in einem folgenden Abschnitt gezeigt wird, bei Esterasen, deren Auswählungsvermögen durch Fremdstoffe beeinflußbar ist, der Reaktions-Mechanismus diesem Einfluß nur bei bestimmter, und zwar niederer, Substratkonzentration unterliegt. In der Wahl des Konzentrations-Gebietes mußte der Affinität des Schweineleber-Enzyms, die uns auf Grund der ersten Untersuchung dieser Reihe als sehr hoch bekannt ist, Rechnung getragen werden.

<sup>15)</sup> H. D. Dakin, Proceed. chem. Soc. London **19**, 161 [1903]; Journ. Physiol. **30**, 253 [1904], **32**, 199 [1905].

<sup>16)</sup> R. Willstätter, R. Kühn u. E. Bamann, B. **61**, 886 [1928].

<sup>17)</sup> Die Löslichkeit des Esters beträgt nach R. Willstätter u. Fr. Memmen, Ztschr. physiol. Chem. **188**, 216 [1924], u. zw. S. 253, 0.805 g : 50 ccm bei 20°.

Tabelle 2.

Unabhängigkeit des optischen Auswählens der Schweineleber-Esterase von der Art der Enzym-Darstellung und von der Reaktions-Temperatur.

(Die Analysenproben von 50 ccm enthielten 0.25 g rac. Mandelsäure-äthylester, 2 g Phosphat  $p_H = 7.0$  und 5 Lipase-Einheiten<sup>13</sup>).

Versuch	Herkunft des Enzyms	Re- akt.- Temp.	Re- akt.- Dauer (Stdn.)	Spalt. (Proz.)	Drehungs- winkel der Mandelsäure (10 ccm, I = 2)	$[\alpha]_D$ der Mandel- säure
1 a	Preßsaft aus frischer Schweineleber 2 .....	25°	2	5.5	+0.18°	+77.8°
b	"	25°	6	16.4	+0.51°	+73.5°
c	"	25°	22	64.8	+0.97°	+35.4°
d	"	25°	25	72.8	+0.65°	+21.2°
2 a	Glycerin-Auszug aus frischer Schweineleber 2 .....	25°	2	5.3	+0.17°	+76.0°
b	"	25°	6	16.1	+0.50°	+73.5°
c	"	25°	25	68.3	+0.82°	+28.4°
3 a	Auszug aus getrockneter Schweineleber 2 .....	25°	2	6.1	+0.19°	+74.2°
b	"	25°	6	17.5	+0.53°	+72.0°
c	"	25°	9	28.1	+0.82°	+69.1°
4 a	"	40°	1 1/2	13.3	+0.40°	+71.5°
b	"	40°	5 1/3	43.8	+1.10°	+59.3°
5	"	12°	25	19.9	+0.61°	+72.6°
6 a	Auszug aus getrockneter Schweineleber 1 .....	25°	2	4.3	+0.14°	+76.7°
b	"	25°	4	9.7	+0.30°	+73.5°
c	"	25°	24	57.0	+1.10°	+45.7°
d	"	25°	32 1/2	81.5	+0.37°	+10.8°

Selbst unter diesen Bedingungen konnten wir in drei von vier Beispielen nur eine recht unbedeutende Änderung des optischen Auswählens bei Zusatz von Strychnin feststellen, während in einem Fall der Wert der spezif. Drehung der Mandelsäure vollkommen unverändert blieb. Die Unterschiede in den Werten für  $[\alpha]_D$  betragen in Vers. 11 etwa 7° (+44.4° gegenüber +51° bei 51% Spalt.), in Vers. 13 etwa 10° (+39.8° gegenüber +50° bei 52% Spalt.) und in Vers. 19 mit einer anderen Enzym-Probe etwa 8° (+35.3° gegenüber 43° bei 30% Spalt.). Es muß als unentschieden gelten, ob in diesen Abweichungen eine durch den Zusatz von Strychnin hervorgerufene Beeinflussung des optischen Auswählens zu sehen ist.

#### Einfluß von Alkaloiden auf die optische Spezifität der Menschenleber- und der Kaninchenleber-Esterase.

Wenn in den Versuchen mit Schweineleber-Esterase die Wirkung zugesetzter Fremdstoffe auf das stereochemische Auswählen dieses Enzyms nicht so deutlich gemacht werden konnte, daß ihr Einfluß außer Zweifel steht, so tritt dieser bei den Esterasen der Menschenleber und der Kaninchenleber ungemein scharf hervor. Wählt man für die Racemat-Hydrolyse durch Menschenleber-Esterase eine Substrat-Konzentration von 0.25 g in 50 ccm

Tabelle 3.

Einfluß von Fremdstoffen auf die stereochemische Spezifität der Schweineleber-Esterase in verschiedenen Konzentrationen des Racemates.

(Die Puffer-Mengen betrugen pro Analysenprobe (Stab 5) in den Vers. 1 mit 9 u. 14 mit 17: 2 g, in den Vers. 10 u. 11: 0.5 g, in den Vers. 18 u. 19: 0.2 g, in den Vers. 12, 13, 20, 21: 0.0 g Phosphat  $p_H = 7$ ;  $t = 25^\circ$ .)

Versuch	Herkunft des Enzyms	Menge (Lipase- Einhei- ten) <sup>12)</sup>	Zusätze (mg)	Substrat- Konzentrat. (g./ccm)	Reakt.-Dauer (Stdn.)	Spaltung (Proz.)	Hamnung d. Reak- tions- geschwindig- keit (Proz.)	Dreh- Winkel der Mandel- säure (10 ccm, $l = 2$ )	$[\alpha]_D$ der Mandel- säure
1	Schweine- leber 2	5	—	0.25:50	6	17.5	—	+0.53°	+72.0°
2		5	Strychnin,	100	0.25:50	16 $\frac{1}{4}$	37.8	20	+1.06°
3	"	10	"	10	0.25:50	3	16.0	9	+0.50°
4	"	5	Chinidin,	100	0.25:50	16 $\frac{1}{4}$	28.8	41	+0.82°
5	"	10	"	10	0.25:50	3	15.1	14	+0.46°
6	"	10	Chinin,	10	0.25:50	6	28.2	19	+0.82°
7	"	10	Brucin,	10	0.25:50	3	17.2	(2)	+0.53°
8	"	10	Codein,	10	0.25:50	3	17.7	—	+0.55°
9	"	10	Atoxyl,	10	0.25:50	8	7.2	85	+0.22°
10	"	5	—	0.2:2000	16 $\frac{1}{4}$	60.7	—	+0.89°	+43.5°
11	"	5	Strychnin,	500	0.2:2000	19	51.3	26	+0.77°
12	"	5	—	0.1:4000	16 $\frac{1}{4}$	73.1	—	+0.30°	+24.6°
13	"	5	Strychnin,	400	0.1:4000	16 $\frac{1}{4}$	52.2	29	+0.35°
14	Schweine- leber 1	15	—	0.25:50	3	21.0	—	+0.65°	+73.7°
15	"	15	Strychnin,	50	0.25:50	5	29.2	17	+0.94°
16	"	20	Chinidin,	100	0.25:50	6	42.0	25	+1.08°
17	"	15	Chinin,	50	0.25:50	5	33.3	(5)	+1.04°
18	"	2.5	—	0.2:2000	16 $\frac{1}{4}$	36.5	—	+0.48°	+38.9°
19	"	2.5	Strychnin,	500	0.2:2000	20 $\frac{1}{2}$	30.2	32	+0.36°
20	"	10	—	0.1:4000	3	46.7	—	+0.14°	+17.7°
21	"	10	Strychnin,	1000	0.1:4000	4	35.3	43	+0.15°

Reaktionsflüssigkeit bei Gegenwart von 2 g Phosphat-Puffer, so erfolgt die Spaltung ziemlich unspezifisch, d. h. die Umsatzgeschwindigkeit für die Antipoden ist fast gleich, und die Werte für  $[\alpha]_D$  der Mandelsäure sind demnach schon von Beginn der Reaktion an sehr niedrig und nehmen mit steigendem Spaltungsgrad weiterhin ab. Die Beispiele 1a-d der Tabelle 4 weisen für 10, 25, 44, 60 % Spaltung die Werte  $[\alpha]_D = +9^\circ, +8^\circ, +4^\circ, +3^\circ$  auf. Das gleiche Resultat geben Versuche mit dem Enzym zweier weiterer Menschenlebern (Vers. 14a und b und Vers. 17). Fügt man diesem Versuchs-Ansatz Alkaloide in Mengen von 10–200 mg zu, so ändert sich das Auswählen, und zwar so, daß bei kleinen Zusatzmengen die positiven Werte von  $[\alpha]_D$  fallen und bei größeren Mengen von niederen zu hohen negativen Werten ansteigen. Die Versuche der Tabelle 4 zeigen den verschieden starken Einfluß mehrerer Pflanzenbasen. Es ist bemerkenswert, daß Strychnin und Brucin, in ihrer chemischen Konstitution nur wenig verschieden, sich in der Tabelle als Extreme gegenüberstehen. Bei ähnlichen Spaltungsgraden (32 bzw. 41 %) erzielten wir für  $[\alpha]_D$  mit 100 mg Brucin den Wert = +1.5°, entsprechend einem Unterschied von 5°, mit 100 mg Strychnin den Wert = -72.2°, entsprechend einem Unterschied von etwa 80°. Mit der Änderung des optischen Auswählens ist

meistens auch eine Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit der Racemat-Spaltung verbunden. Die Versuche 2, 3 und 4 mit wechselnden Mengen Strychnin zeigen eine annähernd parallele Beeinflussung der beiden Erscheinungen. Doch ist darin wohl nur eine Zufälligkeit zu erblicken. Die optische Spezifität ist bedingt durch das Verhältnis der Umsatzgeschwindigkeiten der spiegelbildlichen Ester, die ihrerseits wiederum von den Dissoziationskonstanten und den Zerfallsgeschwindigkeiten der Reaktions-Zwischenprodukte abhängen. Die Änderung der optischen Spezifität kommt zustande durch eine bedeutende Steigerung der Umsatzgeschwindigkeit des (-)-Esters (bei gleichbleibender oder nur wenig erhöhter Umsatzgeschwindigkeit des (+)-Esters oder durch eine starke Hemmung der Umsatzgeschwindigkeit des (+)-Esters, möglicherweise auch durch das Zusammenwirken beider Erscheinungen. Somit kann mit einer Änderung des Auswählens eine Beschleunigung oder eine Hemmung der Reaktionsgeschwindigkeit der Racemat-Spaltung verbunden sein, oder es bleibt, wenn sich der erhöhte Umsatz des einen Antipoden und der erniedrigte des anderen die Wage halten, überhaupt jeder Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit aus. Diese Folgerungen werden durch die verschiedenen Beispiele der Tabellen gestützt.

Tabelle 4.  
Einfluß von Alkaloiden auf das optische Auswählen der Menschenleber-Esterase.

(Die Analysenproben von 50 ccm enthielten 0.25 g rac. Mandelsäure-äthylester, 2 g Phosphat  $p_H = 7$  und 6 Lipase-Einheiten<sup>18</sup>;  $t = 25^\circ$ .)

Versuch	Herkunft des Enzyms	Zusätze (mg)	Reakt.- Dauer (Stdn.)	Spaltung (Proz.)	Beschleu-	Hem-	Dreh.-	$[\alpha]_D$
					nigung	mung	Winkel	
				d. Reakt.-Ge- schwindigk. (Proz.)			der Mandelsäure (10 ccm, $i = 2$ )	
1a	Menschen- leber 1	—	1 $\frac{3}{4}$	10.2	—	—	+0.04°	+ 9.3°
b	"	—	4 $\frac{1}{4}$	24.7	—	—	+0.08°	+ 7.7°
c	"	—	8	43.8	—	—	+0.08°	+ 4.3°
d	"	—	II	60.0	—	—	+0.08°	+ 3.2°
2	"	Strychnin, 200	3 $\frac{1}{2}$	43.1	II 2	—	-1.53°	-84.1°
3	"	" 100	3 $\frac{1}{2}$	41.1	102	—	-1.25°	-72.2°
4	"	" 50	3 $\frac{1}{2}$	30.2	49	—	-0.51°	-40.1°
5	"	" 10	6	33.9	—	(3)	-0.10°	-7.0°
6	"	Cinchonin, 100	5 $\frac{1}{2}$	38.9	22	—	-0.37°	-22.5°
7	"	" 10	6	34.3	—	(2)	+0.04°	+ 2.8°
8	"	Chinidin, 100	4	20.8	—	II	-0.22°	-25.10°
9	"	" 10	6	35.5	—	—	+0.03°	+ 2.0°
10	"	Morphin, 100	5 $\frac{1}{2}$	34.5	8	—	$\pm 0.00^0$	$\pm 0.0^0$
11	"	" 10	6	32.0	—	9	+0.04°	+ 3.0°
12	"	Brucin, 100	5 $\frac{1}{2}$	32.3	—	—	+0.02°	+ 1.5°
13	"	" 10	6	32.8	(6)	—	+0.05°	+ 3.6°
14a	Menschen- leber 2	—	3	37.9	—	—	+0.16°	+ 10.0°
b	"	—	6 $\frac{1}{2}$	73.0	—	—	+0.20°	+ 6.5°
15	"	Strychnin, 100	1 $\frac{1}{2}$	28.8	52	—	-0.87°	-71.5°
16	"	Cinchonin, 100	7 $\frac{1}{2}$	60.5	—	37	$\pm 0.00^0$	$\pm 0.0^0$
17	Menschen- leber 3	—	4	12.1	—	—	+0.06°	+ 11.7°
18	"	Strychnin, 100	2 $\frac{3}{4}$	14.0	75	—	-0.28°	-47.0°

Prüft man den Einfluß von Alkaloiden bei schwach alkalischer, neutraler und schwach saurer Reaktion, so findet man ihn am ausgeprägtesten bei Anwesenheit des freien Alkaloids; Parallelversuche: 0.25 g Ester, 6 Lipase-Einheiten<sup>18)</sup>, 100 mg Strychnin und 2 g Phosphat-Puffer in 50 ccm Reaktionsflüssigkeit ergaben folgende Werte:

$P_H$	Reaktionsdauer (Std.)	Spaltung (Proz.)	Dreh.-Winkel d. Mandelsäure	$[\alpha]_D$ der Mandelsäure
7.5	3 $\frac{3}{4}$	43.0	-1.63°	-89.8°
7.0	3 $\frac{3}{4}$	40.2	-1.13°	-66.7°
6.5	3 $\frac{3}{4}$	29.6	-0.50°	-40.1°

Bei den Versuchen mit Kaninchenleber-Esterase, die in Tabelle 5 wiedergegeben sind, tritt der Einfluß von Zusätzen zum Spaltungsgemisch ebenfalls sehr deutlich hervor. Er äußert sich hier jedoch in einer Bevorzugung der (+)-Komponente des racemischen Substrates, also durch eine Erhöhung der  $[\alpha]_D$ -Werte in positivem Sinne. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist im allgemeinen gehemmt, mit Ausnahme des Versuches 8 mit Strychnin, der Erwähnung verdient, weil bei gleichbleibender Umsatzgeschwindigkeit das  $[\alpha]_D$  doch die erwartete Verschiebung aufweist.

Tabelle 5.

### Beeinflussung des optischen Auswählens der Kaninchenleber-Esterase durch Alkaloide.

(Die Analysenproben von 50 ccm enthielten 0.50 g rac. Mandelsäure-äthylester, 2 g Phosphat  $P_H = 7$  und 12 Lipase-Einheiten<sup>18)</sup>;  $t = 25^\circ$ .)

Versuch	Herkunft des Enzyms	Zusätze (mg)	Reakt. Dauer (Std.)	Spaltung (Proz.)	Beschleu- nigung d. Reakt.-Ge- schwindigk. (Proz.)	Hem- mung d. Reakt.-Ge- schwindigk. (Proz.)	Dreh.- Winkel der Mandel- säure (10 ccm; 1 = 2)	$[\alpha]_D$ der Mandelsäure
1	Kaninchen- leber 1	—	15 $\frac{1}{2}$	26.0	—	—	+0.02°	+ 0.9°
2	„	Strychnin, 100	15 $\frac{1}{2}$	23.8	—	8	+0.36°	+17.9°
3	„	Chinidin, 100	15 $\frac{1}{2}$	4.7	—	82	+0.10°	+25.3°
4	„	„ 100	4 $\frac{3}{4}$	13.2	—	81	+0.20°	+17.9°
5	„	Cinchonin, 100	4 $\frac{3}{4}$	21.2	—	70	+0.17°	+ 9.5°
6	„	Chinin, 100	15 $\frac{1}{2}$	18.8	—	28	+0.07°	+ 4.4°
7	Kaninchen- leber 2	—	15 $\frac{3}{4}$	22.6	—	—	+0.11°	+ 5.8°
8	„	Strychnin, 100	15 $\frac{3}{4}$	22.9	—	—	+0.32°	+16.5°

### Die Beeinflußbarkeit in verschiedenen Gebieten der Substratkonzentration.

Für das stereochemische Auswählen der Esterasen ist es in vielen Fällen nicht gleichgültig, bei welcher Konzentration des Racemates die Hydrolyse vor sich geht. Die Bedeutung dieses Umstandes geht daraus hervor, daß durch geeignete Wahl der Konzentration die spezif. Drehung hinsichtlich der Größe und sogar hinsichtlich des Sinnes festgelegt werden kann<sup>18)</sup>. Wir haben

<sup>18)</sup> E. Bamann, B. 62, 1538 [1929].

nun in einigen Versuchen geprüft, ob die Beeinflußbarkeit der Reaktionsgeschwindigkeit und des optischen Auswählens durch Zusätze unabhängig ist von der Substrat-Konzentration, oder ob mit ihrer Variation eine Änderung hinsichtlich des Ausmaßes oder gar des Sinnes verbunden ist. Die Versuche mit den Esterasen aus Menschen- und Kaninchenleber (Tabelle 6) ergaben das übereinstimmende Resultat, daß der Einfluß von Fremdstoffen hinsichtlich des optischen Auswählens nur in niederen Konzentrationen sich bemerkbar macht und durch Erhöhung der Konzentration ausgeschaltet werden kann, während die Beeinflußbarkeit der Reaktionsgeschwindigkeit (Mensch : Aktivierung, Kaninchen : Hemmung) — wenn auch in verringertem Maße — bestehen bleibt.

Tabelle 6.

Vergleich des Alkaloid-Einflusses auf die stereochemische Spezifität von Esterasen bei verschiedener Substrat-Konzentration.

(Die Angaben beziehen sich auf 50 ccm Analysenprobe. Die Vers. 1 mit 3 sind mit 1.2 Lipase-Einheiten, die Vers. 4 mit 7 mit 6 Lipase-Einheiten, die mit Kaninchenleber-Esterase mit 50 Lipase-Einheiten<sup>18)</sup> ausgeführt; t = 25°.)

Versuch	Herkunft des Enzyms	Zusätze (mg)	Menge (g)	Ester	Reaktionsdauer (Std.)	Spaltung (Proz.)	Beschleunigung d. Reakt.-Geschwindigk. (Proz.)	Hemmung d. Reakt.-Geschwindigk. (Proz.)	Dreh-Winkel der Maudel-säure (10 ccm; 1 = 2)	[α] <sub>D</sub> der Mandel-säure
1a	Menschen-leber 1	—	0.025	0.2	1 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>	11.0	—	—	-0.03°	65.0°
b	„	—	0.025	0.2	3	24.5	—	—	-0.06°	58.3°
c	„	—	0.025	0.2	6 <sup>1</sup> / <sub>4</sub>	44.4	—	—	-0.10°	53.5°
2	„	Strychnin, 100	0.025	0.2	3 <sup>1</sup> / <sub>4</sub>	48.7	85	—	-0.22°	-107.0°
3	„	„ 20	0.025	0.2	3 <sup>1</sup> / <sub>4</sub>	50.2	90	—	-0.16°	75.5°
4	„	—	0.5	2.0	3 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>	12.1	—	—	+0.37°	+ 36.2°
5	„	Strychnin 100	0.5	2.0	3 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>	15.2	25	—	-0.16°	12.5°
6	„	—	2.0	4.0	6 <sup>3</sup> / <sub>4</sub>	1.6	—	—	+0.29°	+ 53.8°
7	„	Strychnin, 100	2.0	4.0	6 <sup>3</sup> / <sub>4</sub>	2.1	31	—	+0.39°	+ 54.8°
8a	Kaninchen-leber 2	—	0.5	3.0	3 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>	24.8	—	—	+0.63°	+ 30.0°
b	„	—	0.5	3.0	6 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>	38.6	—	—	+0.75°	+ 23.0°
9	„	Strychnin, 100	0.5	3.0	3 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>	16.4	—	34	+0.53°	+ 38.5°
10	„	Chinin, 100	0.5	3.0	3 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>	6.5	—	74	+0.23°	+ 42.0°

In sehr verdünnter Lösung (0.025 g Ester : 50 ccm) bewirkt der Zusatz von 100 mg Strychnin zu Menschenleber-Esterase eine Änderung des Wertes von [α]<sub>D</sub> um 54° (Vers. 1c und 2 der Tabelle 6), in mäßig verdünnter Lösung (0.25 g : 50 ccm) eine solche von 76° (nach Tab. 4 Vers. 1c und 3). Eine Erhöhung (0.5 g Ester auf 50 ccm) vermindert sie auf 48° (Vers. 4 und 5 der Tab. 6) und in den Versuchen 6 und 7, bei denen für eine ständige Sättigung der Reaktionslösung mit Substrat gesorgt ist, tritt keine Änderung des Auswählens mehr ein. Bei Kaninchenleber-Esterase sind die Verhältnisse ähnlich. Wir vergleichen die Versuche 7 und 8 der Tabelle 5 (0.5 g Ester : 50 ccm bei Anwesenheit von nur 2 g Puffer), die einen Unterschied in den [α]<sub>D</sub>-Werten von etwa 10° (+5.8° ohne Zusatz bzw. +16.5° mit Strychnin) aufweisen mit den Werten der Versuche 8 und 9 der Tabelle 6 (0.5 g Ester auf 50 ccm bei

Anwesenheit von 3 g Puffer). Dem Wert  $[\alpha]_D = +38.5^\circ$  (Vers. 9 mit Strychnin) steht der aus den Versuchen 8a und b (ohne Zusatz) für 16% Spaltung extrapolierte Wert  $[\alpha]_D = +35^\circ$  gegenüber. Auch in dem Chinin-Versuch (Nr. 10) hat keine nennenswerte Beeinflussung des Auswählens mehr stattgefunden; denn die Werte für  $[\alpha]_D$  bei gleichen Spaltungsgraden (6%) betragen ohne Zusatz  $+39^\circ$ , mit Chinin  $+42^\circ$ .

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft sind wir für die Förderung unserer Untersuchungen zu aufrichtigem Dank verpflichtet.

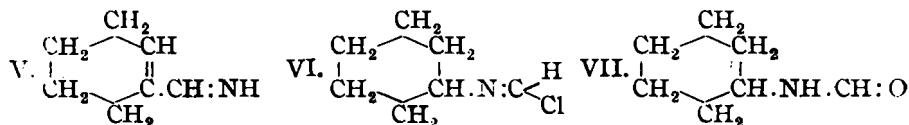
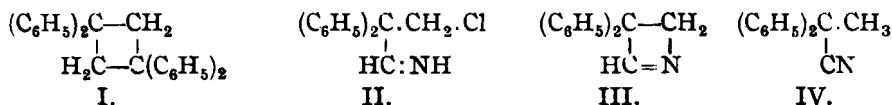
### 53. Heinrich Wieland und Eugen Dorrer: Einige Beobachtungen über die Einwirkung von Blausäure-Chlorwasserstoff und $\text{AlCl}_3$ auf ungesättigte Kohlenwasserstoffe<sup>1)</sup>.

[Aus d. Chem. Laborat. d. Bayer. Akademie d. Wissensch. zu München.]  
(Eingegangen am 28. Dezember 1929.)

Während Enole, wie Acetessigester und Acetyl-aceton, ganz im Einklang mit der Gattermannschen Synthese aromatischer Aldehyde, bei Gegenwart von  $\text{AlCl}_3$  und HCl Blausäure zu Aldiminen anlagern:  $\text{R.C(OH)} : \text{CH.R}' \rightarrow \text{R.CO.CH(CH:NH).R}'$ , ist unseres Wissens noch nichts darüber bekannt, ob auch die olefinische Doppelbindung unter den gleichen Bedingungen Blausäure aufzunehmen vermag. Aromatische Kohlenwasserstoffe sind dieser Reaktion nicht zugänglich.

Da ungesättigte Verbindungen schon durch Aluminiumchlorid allein nach verschiedenen Richtungen hin verändert werden, gelang es nur in wenigen Fällen, die Blausäure in durchsichtiger Weise zur Umsetzung zu bringen, nämlich beim Cyclohexen und beim *asymm.* Diphenyl-äthylen. Styrol entzog sich durch rascher erfolgende Polymerisation ihrem Zugriff, und auch beim Stilben haben wir anstelle des N-haltigen Additionsproduktes einen bisher nicht beschriebenen dimeren Kohlenwasserstoff erhalten. Triphenyl-äthylen ging aus dem Versuchsansatz über eine halochrome Anlagerungsverbindung mit  $\text{AlCl}_3$  unverändert hervor.

*asymm.* Diphenyl-äthylen: Etwa 30% des Kohlenwasserstoffs entziehen sich der Reaktion durch Polymerisation zu dem bereits auf anderem Wege dargestellten 1.1.3.3-Tetraphenyl-cyclobutan (I). Als Produkt



<sup>1)</sup> Diese Untersuchung schließt sich zwei früheren Arbeiten über die Durchführung der Friedel-Craftsschen Reaktion bei Verbindungen der Fettreihe an, nämlich H. Wieland u. L. Bettag, Zur Kenntnis der Friedel-Craftsschen Reaktion, B. 55, 2246 [1922], und H. Wieland u. E. Dorrer, Die Gattermannsche Aldehyd-Synthese bei Enolen, B. 58, 818 [1925].