

Das Reaktionsgemisch wird abgekühlt, durch Zusatz von Eis und verd. Essigsäure zersetzt und ausgeäthert und die Äther-Lösung über Calciumchlorid getrocknet. Beim vorsichtigen Verdampfen des Äthers kristallisiert das *N*-Oxyisopropyl-indol (IV) in farblosen, schönen Nadelchen aus. Es hat einen schwachen, aber charakteristischen Geruch, der von dem des Indols deutlich verschieden ist. Die Substanz löst sich leicht in Alkohol, Benzol, Chloroform, Eisessig und Schwefelkohlenstoff. Sie läßt sich aus Kohlenstofftetrachlorid, Äther oder Petroläther (Sdp. 50–60°) umkristallisieren und schmilzt rein bei 85–86°; bei etwa 127° zersetzt sie sich unter Aufschäumen. Die Ausbeute beträgt über 75% (6.4 g).

$C_{11}H_{13}ON$ (175.2) Ber. C 75.38 H 7.48 N 8.00 1 akt. H
Gef. C 75.05 H 7.76 N 8.19, 1.04, 0.92 akt. H⁷⁾

Das Vorhandensein von nur einem aktiven Wasserstoffatom schließt die Konstitution eines β -Oxyisopropyl-indols aus und stützt die Annahme, daß das *N*-Oxyisopropyl-indol (IV) vorliegt.

Mischt man auf einer Tonplatte das *N*-Oxyisopropyl-indol mit Indol, so schmilzt das Gemisch sofort.

Auffallenderweise dissoziiert das *N*-Oxyisopropyl-indol beim Aufbewahren bei Zimmertemperatur allmählich in Indol und Aceton. Nach 6 Monate langem Stehen im Reagensglas hatte sich die Substanz vollkommen verflüssigt. In der Flüssigkeit konnten Indol, Aceton und wenig Di- β -indolyl-dimethyl-methan (V; aus Alkohol Schmp. 165 bis 166°) nachgewiesen werden. Kocht man eine Lösung von *N*-Oxyisopropyl-indol in Kohlenstofftetrachlorid einige Stunden, so kristallisiert beim Abkühlen kein *N*-Oxyisopropyl-indol, sondern eine geringe Menge Di- β -indolyl-dimethyl-methan (V) aus; in der Mutterlauge lassen sich Indol und Aceton nachweisen.

134. Senji Utzino und Toshio Yoneya: Über das Verhalten der Acyl-*d,l*-lysine gegenüber Nieren-Enzym*)

[Aus dem Institut für Medizinische Chemie der Medizinischen Fakultät der Universität Kyoto, Japan]

(Eingegangen am 18. März 1952)

α -Chloracetyl- ϵ -benzoyl-*d,l*-lysin wird bei pH 7.0 im Gegensatz zu ϵ -Acylamino-*n*-capronsäuren sowie α -Acyl- ϵ -benzoyl-*d,l*-lysinen von Schweinenieren-Enzym angegriffen. Über die enzymatische Spaltung des α -Chloracetyl- ϵ -benzoyl-*d,l*-lysins in die optischen Antipoden wurden die Dihydrochloride des *d*- bzw. *l*-Lysins gewonnen. Als Zwischenprodukt auf dem Wege zum *l*-Lysin wurde ϵ -Benzoyl-*l*-lysin isoliert.

In Übereinstimmung mit den Angaben von I. A. Smorodinzew¹⁾ sind von der Schule Neubergs^{2,3)} und dann auch von H. Kimura im hiesigen Institut⁴⁾ Untersuchungen über die durch Enzyme bewirkte asymmetrische Spaltung der Acyl-*d,l*-aminosäuren angestellt worden. Neuerdings haben J. P.

⁷⁾ Die Bestimmung wurde in Amyläther bei Zimmertemperatur durchgeführt.

*) Meinem sehr verehrten Lehrer, Geheimrat Professor Dr. H. Wieland, zum 75. Geburtstag gewidmet. S. Utzino.

¹⁾ Ztschr. physiol. Chem. 124, 123 [1923].

²⁾ C. Neuberg u. K. Linhardt, Biochem. Ztschr. 147, 372 [1924].

³⁾ C. Hoppert, Biochem. Ztschr. 149, 510 [1924].

⁴⁾ Journ. Biochem. 10, 207, 225 [1929].

Greenstein und Mitarbb.^{5 14)} über die Spaltung zahlreicher Aminosäuren durch die selektiv hydrolysierende Wirkung von Schweineenzym berichtet.

Die Spaltung von *d,l*-Lysin in die optischen Antipoden gelang zuerst C. P. Berg¹⁵⁾ nach der Camphersäure-Methode. In diesem Zusammenhang interessieren auch die Beobachtungen von H. Borsook¹⁶⁾ und von D. G. Doherty und E. A. Popenoe¹⁷⁾ über die durch Papain bewirkte asymmetrische Anilid-Synthese sowie von T. Yoneya¹⁸⁾ über die gleiche durch Ficin bewirkte Synthese.

Bei ihren Versuchen über die enzymatische Spaltung eines Acyl-*d,l*-lysins durch Schweineniere haben Greenstein und Mitarbb.⁸⁾ α,ϵ -Di-chloracetyl-*d,l*-lysine als Substrat verwendet; sie isolierten als Zwischenprodukt kristallines ϵ -Chloracetyl-*l*-lysine, nicht aber α,ϵ -Di-chloracetyl-*d,l*-lysine.

Nachdem wir beobachtet hatten, daß sich ϵ -Benzoylamino-*n*-capronsäure durch die Acylase-Wirkung von Schweineniere, Ochsenpankreas, Mäuseniere oder -leber überhaupt nicht hydrolysieren ließ, tauchte die Frage auf, ob ϵ -Acylamino-capronsäuren oder α -Acyl- ϵ -benzoyl-*d,l*-lysine enzymatisch angreifbar sind.

Wie aus der Tafel ersichtlich ist, vermag Schweineniere, Mäuseniere oder -leber das α -Chloracetyl- ϵ -benzoyl-*d,l*-lysine nur beschränkt zu spalten, und zwar bis zur Hälfte des eingesetzten Acyl-*d,l*-lysins, während Ochsenpankreas das Substrat überhaupt nicht angreift. Diese Ergebnisse sprechen für die stereochemische Spezifität der Acylase-Wirkung der Schweineniere.

Es ist uns schließlich gelungen, mit Nierenacylase das α -Chloracetyl- ϵ -benzoyl-*d,l*-lysine in die optischen Antipoden zu spalten. Als ein Zwischenprodukt der Hydrolyse haben wir ϵ -Benzoyl-*l*-lysine (Zersp. 267–268°; $[\alpha]_D^{20}$: +17.1°, 3-proz. Lösung in 6*N* HCl) in schönen Kristallen isoliert. Durch Hydrolyse mit Salzsäure haben wir schließlich die reinen kristallisierten Dihydrochloride des *l*- und *d*-Lysins gewonnen.

⁵⁾ P. J. Fodor, V. E. Price u. J. P. Greenstein, Journ. biol. Chem. **178**, 503 [1949].

⁶⁾ V. E. Price, J. B. Gilbert u. J. P. Greenstein, Journ. biol. Chem. **179**, 1169 [1949].

⁷⁾ J. B. Gilbert, V. E. Price u. J. P. Greenstein, Journ. biol. Chem. **180**, 473 [1949].

⁸⁾ J. P. Greenstein, J. B. Gilbert u. P. J. Fodor, Journ. biol. Chem. **182**, 451 [1950].

⁹⁾ J. P. Greenstein u. L. Levintow, Journ. Amer. chem. Soc. **72**, 2812 [1950].

¹⁰⁾ L. Levintow u. J. P. Greenstein, Journ. biol. Chem. **188**, 643 [1951].

¹¹⁾ J. P. Greenstein, L. Levintow, C. G. Baker u. J. White, Journ. biol. Chem. **188**, 647 [1951].

¹²⁾ L. Levintow, J. P. Greenstein u. R. B. Kingsley, Arch. Biochem. and Biophys. **31**, 77 [1951].

¹³⁾ L. Levintow, V. E. Price u. J. P. Greenstein, Journ. biol. Chem. **184**, 55 [1950].

¹⁴⁾ D. Hamer u. J. P. Greenstein, Journ. biol. Chem. **193**, 81 [1951].

¹⁵⁾ Journ. biol. Chem. **115**, 9 [1936].

¹⁶⁾ H. Borsook, C. L. Deasy, A. J. Haagen-Smit, G. Keighley u. P. H. Lowy, Journ. biol. Chem. **176**, 1383 [1948], **184**, 529 [1950].

¹⁷⁾ Journ. biol. Chem. **189**, 447 [1951].

¹⁸⁾ Journ. Biochem. (Japan) **38**, 343 [1951].

Beschreibung der Versuche

Bereitung des Nierenextrakts: Frische Schweineniere wurde zerkleinert und zweimal mit der fünffachen Menge Aceton gut verrieben. Die breiige Masse wurde abgesaugt und im Vak.-Exsiccator getrocknet. Das Acetonpulver wurde mit der 7fachen Menge Wasser $\frac{1}{2}$ Stde. gerührt und zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit vom pH 7.0 wurde als Nierenextrakt verwandt.

Verhalten von Acyl-lysinen gegenüber dem Enzym: Über die Darstellung der in der Tafel aufgeführten Verbindungen haben wir schon berichtet¹⁸⁾.

Das Gemisch von 10 ccm 0.05 *m* neutraler Substrat-Lösung, 5 ccm 0.07 *m* Phosphatpuffer (pH 7.0) und 10 ccm Extrakt wurde unter Toluolzusatz bei 37° aufbewahrt. Gleichlaufend mit jedem Ansatz wurden Blindversuche durchgeführt, deren Ergebnisse bei der Ermittlung der Hauptwerte berücksichtigt wurden. Die Acidität in jeweils 4 ccm der Ansätze wurde nach der Formaldehyd-Methode von Sørensen mit der Mikrobürette titriert; der Aciditätszuwachs ist in der Tafel wiedergegeben.

Tafel. Verhalten von Acyl-*d,l*-lysinen und ϵ -Acylamino-*n*-capronsäuren gegenüber Enzym

Aciditätszuwachs in 4 ccm des Ansatzes in ccm 0.1 <i>n</i> -NaOH				
Substrate	nach 3	24	45	72 Stdn.
ϵ -Formamino-capronsäure	0.01	0.00	0.00	0.02
ϵ -Acetamino-capronsäure	0.00	0.00	0.00	0.01
ϵ -Chloracetamino-capronsäure	0.00	0.00	0.01	0.01
ϵ -Benzoylamino-capronsäure	0.01	0.00	0.02	0.02
ϵ -Benzoyl- <i>d,l</i> -lysin	0.01	0.02	0.00	0.01
α -Formyl- ϵ -benzoyl- <i>d,l</i> -lysin	0.00	0.02	0.02	0.01
α -Acetyl- ϵ -benzoyl- <i>d,l</i> -lysin	0.00	0.01	0.00	0.03
α -Chloracetyl- ϵ -benzoyl- <i>d,l</i> -lysin	0.08	0.28	0.39	0.40
		(=35%)	(=50%)	(=50%)
α,ϵ -Dibenzoyl- <i>d,l</i> -lysin	0.01	0.01	0.01	—0.01

Enzymatische Spaltung von *d,l*-Lysin in die optischen Antipoden: 9.8 g (0.03 Mol) α -Chloracetyl- ϵ -benzoyl-*d,l*-lysin wurden in 30 ccm *n*-NaOH und 570 ccm Wasser gelöst, mit 500 ccm Extrakt versetzt und bei 37° aufbewahrt. An aliquoten Teilen verfolgten wir das Fortschreiten der Hydrolyse durch Formaldehyd-Titration nach Sørensen. Nach 12stdg. Digerieren waren 50% des Ausgangsmaterials hydrolysiert. Nach weiteren 5 Stdn. wurde das Reaktionsgemisch mit Eisessig auf pH 5 eingestellt, 5 Min. mit 5 g Tierkohle gekocht und abgesaugt. Die abfiltrierte Lösung wurde i. Vak. auf 150 ccm eingengt und nach Zusatz von 450 ccm absol. Alkohol über Nacht im Eisschrank aufbewahrt. Das abgeschiedene ϵ -Benzoyl-*l*-lysin (2.7 g = 72%) wurde abfiltriert und durch Umkristallisieren aus Wasser gereinigt. Farblose Nadeln, die sich bei 267–268° unter Gasentwicklung zersetzen; $[\alpha]_D^{25}$: +17.1° (3-proz. Lösung in 6*n*HCl).

$C_{13}H_{18}O_3N_2$ (250.2) Ber. N 11.2 Gef. N 11.4 (Kjeldahl)

2.5 g ϵ -Benzoyl-*l*-lysin wurden 10 Stdn. mit 30 ccm 6*n*HCl unter Rückfluß gekocht. Dann wurde das Filtrat nach der Methode von J. C. Eck und C. S. Marvel^{18,19)} aufgearbeitet. Das umkristallisierte *l*-Lysin-dihydrochlorid hat eine optische Drehung von $[\alpha]_D^{25}$: +15.6° (3-proz. wäbr. Lösung); Ausb. 1.7 g (78%).

$C_6H_{14}O_2N_2 \cdot 2HCl$ (219.1) Ber. N 12.8 Gef. N 12.7 (Kjeldahl)

Die Mutterlauge des ϵ -Benzoyl-*l*-lysins wurde mit konz. Salzsäure bis zur kongosauren Reaktion angesäuert, i. Vak. bis zur Sirupkonsistenz eingengt und der Rückstand 5mal mit je 100 ccm Essigester extrahiert. Der Extrakt wurde über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. zur Trockne eingedampft. Den sirupösen Rückstand hydrolysierten wir mit 6*n*HCl wie oben beschrieben. Die Ausbeute an *d*-Lysin-dihydrochlorid betrug 2.0 g (61% d. Th.); $[\alpha]_D^{25}$: –15.5° (3-proz. wäbr. Lösung).

$C_6H_{14}O_2N_2 \cdot 2HCl$ (219.1) Ber. N 12.8 Gef. N 12.9 (Kjeldahl)

¹⁹⁾ Org. Syntheses, Coll. 2, 374 [1943].