

Die Acetylierung dieses N-Acetylterivates mit Pyridin und Acetanhydrid führte wieder zum Triacetylterivat vom Smp. 67–68°.

N-Acetylterivat des (*-*)-*threo*-Dihydrosphingosins, Smp. 109°. 100 mg reinstes (*-*)-Aminodiol wurden im Hochvakuum getrocknet und mit 2 cm³ abs. Pyridin und 1 cm³ Acetanhydrid 15 Std. bei 34° stehengelassen. Die klare Reaktionslösung wurde im Vakuum bei 40° zur Trockne verdampft, der Rückstand in Äther aufgenommen und mit 2-n. HCl, 2-n. Sodalösung und Wasser gewaschen. Die über Natriumsulfat getrocknete Ätherlösung hinterliess nach dem Eindampfen ein Öl, das nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte. Bei der Chromatographie an neutralem Aluminiumoxyd war nur ein Teil des Materials eluierbar, der ebenfalls nicht kristallisierte.

Das in einem analogen Versuch erhaltenen ölige Acetylierungsgemisch wurde auf folgende Weise partiell verseift: 175 mg Rohprodukt wurden mit 2,75 cm³ einer 1,5-proz. methanolischen KOH-Lösung versetzt und bei 25° 15 Std. stehengelassen. Schon nach 1 Std. begann sich das N-Acetylterivat kristallin auszuscheiden. Die Kristalle wurden abfiltriert, mit Alkohol und Äther gewaschen und aus Isopropyläther kristallisiert; farblose, feine Blättchen, Smp. 98–99°. Aus Chloroform achteckige Blättchen, aus Äther-Pentan Nadeln.

C ₂₀ H ₄₁ O ₃ N (343,5)	Ber. C 69,92 Gef. „, 69,85	H 12,03 „, 12,04	N 4,08% „, 4,04%
---	-------------------------------	---------------------	---------------------

Das auf gleiche Weise hergestellte N-Acetylterivat des (+)-Aminodiols schmolz ebenfalls bei 98–99°. Die spezifische Drehung war [α]_D^{22,5} = -8,5° (c = 0,95 in Chloroform).

Die Acetylierung der beiden enantiomorphen N-Acetylverbindungen lieferte ebenfalls ein öliges Produkt, das nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte.

Die Mikroanalysen wurden im Mikrolaboratorium der Organisch-Chemischen Anstalt der Universität (Leitung Herr *E. Thommen*) ausgeführt.

SUMMARY.

A stereospecific synthesis of *threo*-dihydrosphingosine is described.

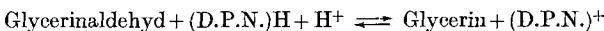
Organisch-Chemische Anstalt der Universität Basel.

184. Über die Glycerindehydrase der Leber

von H. P. Wolf und F. Leuthardt.

(15. VIII. 53.)

Bei der Spaltung des Fructose-1-phosphats durch die 1-Phosphofructaldolase wird als nicht phosphoryliertes Spaltstück D-Glycerinaldehyd gebildet¹). Bei der Untersuchung der weiteren Umwandlungen des Glycerinaldehyds in Extrakten aus Rattenleber haben wir ein Ferment gefunden, welches den Wasserstoff der hydrierten Cozymase auf den DL-Glycerinaldehyd überträgt, wobei Glycerin entsteht:



¹⁾ H. G. Hers & T. Kusaka, IIe Congrès international de biochimie, Paris 1952, Résumés des communications, S. 281; Biochim. Biophys. Acta **11**, 427 (1953); F. Leuthardt, E. Testa & H. P. Wolf, Helv. **36**, 227 (1953).

Das Gleichgewicht der Reaktion liegt bei pH 7,5 stark zugunsten der rechten Seite der obigen Gleichung; man kann deshalb das Enzym auch als Glycerinaldehyd-hydrase bezeichnen. Das Ferment ist für D.P.N. spezifisch; T.P.N. ist unwirksam. Wir haben das Ferment durch den *Warburg'schen* optischen Test bestimmt (Messung der Absorptionsbande der Dihydrocozymase bei $366 \text{ m}\mu$). Das entstandene Glycerin wurde papierchromatographisch sowie chemisch durch Reduktion zu Isopropyljodid mittels HJ bestimmt (Methode von *v. Bruchhausen*¹⁾). Um bei den letztgenannten Versuchen nicht zuviel Cozymase einsetzen zu müssen, haben wir das Fermentsystem mit der Glutaminsäuredehydrase gekoppelt, die in einer der verwendeten Enzymlösungen (B) bereits in genügender Menge vorhanden war. Im kombinierten Fermentsystem wirkt die Cozymase katalytisch.

Die gleichen Fermentlösungen hydrieren auch Dioxyacetone zu Glycerin, jedoch bedeutend langsamer. Wir können noch nicht angeben, ob das Enzym spezifisch auf eine der beiden enantiomorphen Formen des Glycerinaldehyds eingestellt ist. Versuche zur Aufklärung dieser Frage sind im Gange. Gegen kristallisierte Alkoholdehydrase ist der DL-Glycerinaldehyd völlig beständig.

Ein ähnliches Ferment aus zellfreien Extrakten von *Aerobacter aerogenes* wurde kürzlich von *Burton & Kaplan*²⁾ beschrieben. Es scheint aber vom unsrigen verschieden zu sein, da es Dioxyacetone schneller hydriert als Glycerinaldehyd.

Experimenteller Teil.

1. Herstellung der Enzymlösungen. a) *Enzymlösung A*. Rattenleber wurde mit isotonischer KCl-Lösung perfundiert und im Apparat von *Potter & Elvehjem*³⁾ homogenisiert, das Homogenat zentrifugiert und aus dem Überstehenden die Fraktion von 40—60-proz. Ammoniumsulfatsättigung abgetrennt; diese wurde in 0,02-m. NaHCO₃ gelöst und 5 Std. gegen die gleiche Flüssigkeit dialysiert. Die ausgefallenen Proteine wurden abzentrifugiert und die klare überstehende Enzymlösung verwendet.

b) *Acetontrockenpulver aus Schweineleber*. Schweineleber wurde mit dem doppelten Volumen kalten Acetons im „Turmix“ zerkleinert und abgesaugt. Der Rückstand wurde nochmals in Aceton suspendiert, abgesaugt und auf Fliesspapier an der Luft getrocknet.

c) *Enzymlösung B*. 5 g Acetontrockenpulver wurden 20 Min. unter Kühlung mit 20 cm³ 0,1-m. Na₂HPO₄ extrahiert. Nach Zentrifugieren wurde die überstehende Lösung 12 Std. gegen fliessendes Wasser dialysiert, die dabei ausgefallenen Proteine durch Zentrifugieren entfernt und als Fermentlösung die klare überstehende Lösung verwendet.

Im Gegensatz zur Lösung A enthält die Lösung B ausser der Glycerindehydrase auch eine sehr aktive Glutaminsäuredehydrase⁴⁾.

In gefrorenem Zustand sind beide Fermentlösungen mehrere Tage haltbar.

Als Cozymase wurden Präparate der Firma *C. F. Boehringer und Söhne GmbH., Tutzing*, verwendet. Die Dihydrocozymase wurde durch Reduktion mit Natriumdithionit dargestellt⁵⁾.

¹⁾ *F. v. Bruchhausen*, Z. Unters. Lebensm. **68**, 32 (1934).

²⁾ *R. M. Burton & N. O. Kaplan*, Am. Soc. **75**, 1005 (1953).

³⁾ *R. Van Potter & A. Elvehjem*, J. Biol. Chem. **114**, 195 (1936).

⁴⁾ *H. v. Euler, E. Adler, G. Günther & N. B. Das*, Z. physiol. Ch. **254**, 61 (1938).

⁵⁾ Vgl. Biochemical Preparations, Vol. 2, New York 1952, S. 92.

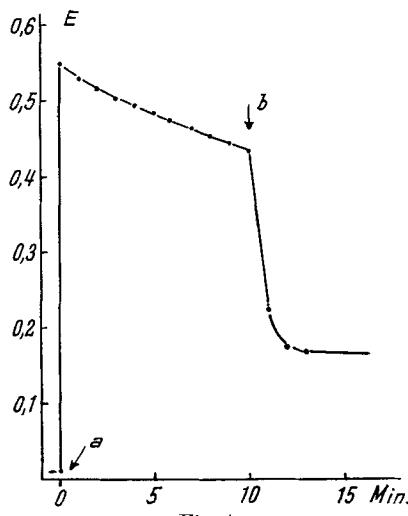
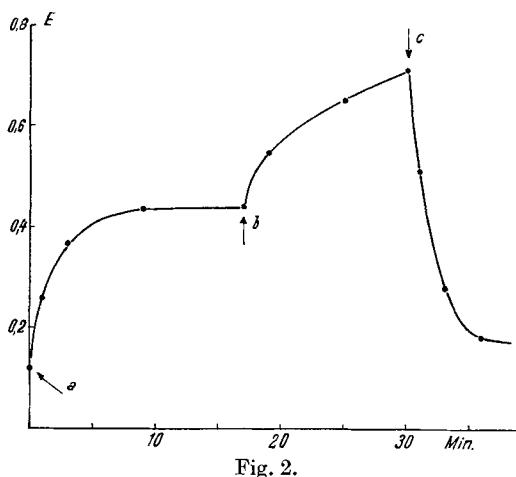


Fig. 1.

Spektrophotometrischer Nachweis der Reduktion des Glycerinaldehyds.

Versuchsansatz: $1,25 \text{ cm}^3$ Veronalpuffer pH 7,5, 1 cm^3 Enzymextrakt A, $2,1 \text{ cm}^3 \text{ H}_2\text{O}$, $0,4 \mu\text{mol}$ (D.P.N.) H_2 ($= 0,082 \mu\text{mol}/\text{cm}^3$). Beim Pfeil a Zugabe der Dihydrocozymase, beim Pfeil b Zugabe von 1 mg Glycerinaldehyd. Abszisse: Zeit in Min.; Ordinate: Extinktion bei $340 \text{ m}\mu$. Die Extinktionen wurden am Photometer „Eppendorf“ der Elektromedizinischen Werkstätten GmbH., Hamburg, bei der Hg-Linie $366 \text{ m}\mu$ gemessen. Für die Umrechnung der abgelesenen Werte auf das Maximum der Absorptionsbande ($340 \text{ m}\mu$) wurde der Faktor 1,72 benutzt. Die Versuche wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt. Eine Umkehrung der Reaktion war nicht nachweisbar.



Nachweis der Glutaminsäuredehydrase.

Versuchsansatz: $1,0 \text{ cm}^3$ Veronalpuffer pH 8,1, $0,5 \text{ cm}^3$ Enzymextrakt B, $0,5 \text{ cm}^3 \text{ H}_2\text{O}$, $1,0 \text{ cm}^3$ Na-Glutaminat ($0,4\text{-m}$). Bei den Pfeilen a und b wurden jeweils $0,2 \text{ cm}^3$ D.P.N.-Lösung zugegeben ($1,0 \text{ mg}/\text{cm}^3$). Beim Pfeil c wurden 2 mg DL-Glycerinaldehyd zugegeben. Abszisse: Zeit in Min.; Ordinate: Extinktion bei $340 \text{ m}\mu$.

2. Nachweis der Glycerinaldehyd-hydrase durch optischen Test. Fig. 1 zeigt die Hydrierung des Glycerinaldehyds durch Dihydrocozymase. Fig. 2 zeigt einen Versuch, bei welchem Cozymase zuerst durch Glutaminsäure reduziert und dann durch Glycerinaldehyd wieder dehydriert wurde. Dieses System gestattet, mit katalytischen Mengen D.P.N. zu arbeiten. Unter den oben angeführten Bedingungen ist nur eine sehr langsame Reduktion des Dioxyacetons feststellbar (vgl. Fig. 3).

Das Gleichgewicht liegt ausserordentlich stark zugunsten des reduzierten Produkts, des Glycerins.

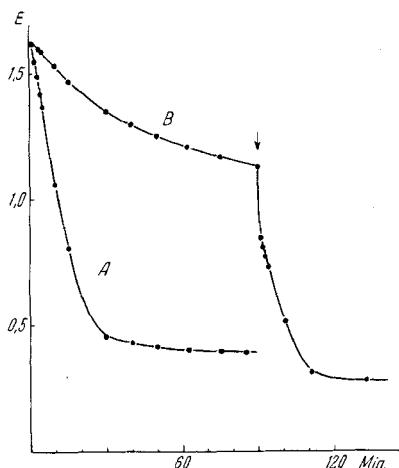


Fig. 3.

Vergleich der Reduktion von Dioxyaceton und Glycerinaldehyd.

Ansatz: 1 cm³ Veronalpuffer pH 7,4, 0,5 cm³ Enzymextrakt B, 0,9 μmol (D.P.N.)H₂, 1,5 cm³ H₂O. Kurve A: 3,0 μmol Glycerinaldehyd; Kurve B: 3,0 μmol Dioxyacetone. Beim Pfeil (Kurve B) wurden 3,0 μmol Glycerinaldehyd zugegeben. Abszisse: Zeit in Min.; Ordinate: Extinktion bei 340 mμ.

Bei einem Mischungsverhältnis von 500 μmol Glycerin und 20 μmol Glycerinaldehyd ist kein Unterschied in der Hydrierungsgeschwindigkeit des Aldehyds feststellbar.

3. Papierchromatographischer Nachweis des Glycerins. *Inkubationsansatz zum chromatographischen Nachweis*. 5 cm³ Enzymlösung B, 3 cm³ Na-Glutaminatlösung (0,4-m.), 5 mg DL-Glycerinaldehyd, 1,5 mg D.P.N. Das pH wurde mit 5-proz. Na₂CO₃ auf 8,4 gebracht. Inkubation: 4 Std. bei 38°.

*Enteiweißung nach Awapara*¹⁾. Zum Inkubationsansatz wurde die dreifache Menge Alkohol zugegeben. Die gefällten Proteine wurden abzentrifugiert, das Überstehende mit der vierfachen Menge Chloroform durchgeschüttelt und die Phasen durch Zentrifugation getrennt. Die wässrige Schicht wurde abgehoben und die verbleibenden organischen Lösungsmittel durch teilweises Eindampfen am Vakuum entfernt. Die Lösung wurde dann von den Elektrolyten durch eine Behandlung mit einer Austauscherkolonne (Amberlite IR-120 und Amberlite IR-4B) befreit. Es wurde mit der vierfachen Menge Wasser nachgewaschen und die Lösung am Vakuum auf 1 cm³ eingedampft.

Zum Entwickeln der Chromatogramme wurde die von Sulser & Högl²⁾ vorgeschlagene Mischung von Pyridin-Wasser-Äthylacetat 1,0:3,5:2,5 verwendet. Das Reagens (0,15-n. AgNO₃) ist im Entwicklungsgemisch bereits enthalten. Papier: Whatman Nr. 1; Entwicklungszeit: 16 Std. im aufsteigenden Chromatogramm. Das Chromatogramm wurde im

¹⁾ J. Awapara, Arch. Biochem. **19**, 172 (1948).

²⁾ H. Sulser & O. Högl, Mitt. Lebensmittelunters. Hyg. **44**, 79 (1953).

Luftstrom getrocknet und 1 Std. in eine gesättigte NH₃-Atmosphäre gehängt und zur Entwicklung der Flecken 15 Min. bei 100° gehalten. Das Glycerin erscheint als schwarzer Fleck auf leicht braunem Hintergrund. Der ursprünglich zugesetzte Glycerinaldehyd war nicht mehr nachweisbar. Vgl. Fig. 4.

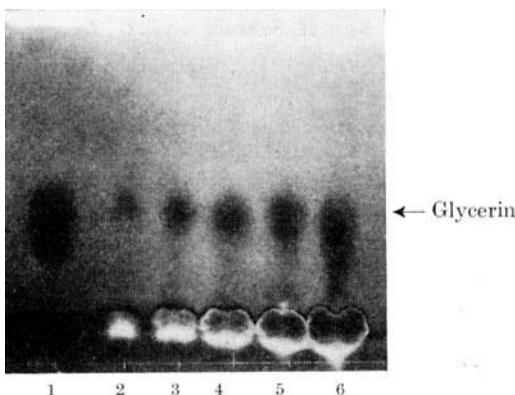


Fig. 4.

Chromatographischer Nachweis des Glycerins.

Chromatogramm 1: Glycerin als Vergleichssubstanz. Chromatogramme 2—6: 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 und 0,5 cm³ der Lösung (siehe Text). Die Flecken oberhalb der Startlinie röhren von Glutaminsäurespuren her, die trotz Behandlung mit dem Austauschharz nicht entfernt werden konnten.

4. Nachweis des Glycerins durch Überführung in Isopropyljodid nach v. Bruchhausen¹⁾. Ansatz: 5 cm³ Enzymextrakt B, 3 cm³ Na-Glutaminat (0,4-n.), 3 cm³ Veronalpuffer pH 8,1, 1,5 mg D.P.N. und 5 mg DL-Glycerinaldehyd wurden 4 Std. bei 38° inkubiert. Der Ansatz wurde mit 3 cm³ Trichloressigsäure (10-proz.) denaturiert und nach Zentrifugieren das Überstehende am Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde mit der Jodwasserstoffsäure in das Zersetzungskölbchen der Methoxylbestimmungsapparatur überführt.

Verbrauch n/30 Thiosulfat: Blindwert (ohne Glycerinaldehyd) 1,12 cm³, Ansatz (mit Glycerinaldehyd) 5,05 cm³, Differenz 3,93 cm³ entspr. 2 mg Glycerin.

Wir möchten Herrn Dr. K. Wallenfels, Tutzing, für die freundliche Überlassung der Cozymase und der Alkoholdehydrase unseren verbindlichen Dank sagen.

SUMMARY.

A D.P.N.-dependent dehydrogenase has been found in rat- and pig-liver extracts. It catalyses the reduction of DL-glyceraldehyde to glycerol. The equilibrium of this reaction strongly favours glycerol. The enzyme acts only weakly on dihydroxyacetone.

Zürich, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität.

¹⁾ F. v. Bruchhausen, Z. Unters. Lebensm. **68**, 32 (1934).