stoffe aufgefunden. Bei diesen handelt es sich weitgehend um natürlich vorkommende Verbindungen und Stoffwechselprodukte. Zur Aufarbeitung wurden die Bananen der Sorte Gros Michel, etwa 10 Tage nach dem Maximum der Atmung (Lagertemperatur +15 °C), was einem Maximum gewisser Aromakomponenten entspricht, mit Methanol homogenisiert. Der Preßsaft des Homogenats wurde mit Pentan/Methylenchlorid (2/1) extrahiert und nach schonendem Einengen die Komponenten auf verschiedenen Trennsäulen präparativ angereichert. Die weitere Trennung und Identifizierung

erfolgte auf Mikropack bzw. Kapillarsäulen teilweise in Kopplung mit einem Massenspektrometer. Zusätzliche Identifizierung wurde durch Retentionsvergleiche, chemische Ausscheidungsanalyse und IR-Mikrotechnik erzielt.

Von den bisher ca. 350 gaschromatographisch getrennten Komponenten konnten die angegebenen 183 Verbindungen identifiziert werden.

Möglicherweise sind einige Methylester auf die Aufarbeitung mit Methanol zurückzuführen.

Malatdehydrogenasen unterschiedlicher Herkunft: Hemmung durch Thyroxin

K. GRASZYNSKI, D. SIEBERS, I. TOFAUTE und I. BRUNNER

II. Zoologisches Institut, Freie Universität Berlin

(Z. Naturforschg. 24 b, 783–784 [1969]; eingegangen am 13. März 1969)

Schweineherz-Malatdehydrogenase wird durch L-Thyroxin weit stärker gehemmt als andere Dehydrogenasen und zwar bereits bei physiologischen Thyroxin-Konzentrationen¹. Im Hinblick auf die Annahme, daß dies eine Primärwirkung des Hormons auf den Stoffwechsel darstellt, scheinen uns die folgenden Beobachtungen an Malatdehydrogenasen unterschiedlicher Herkunft interessant.

Die Enzympräparationen wurden folgendermaßen gewonnen: Homogenisiert in 0,25 M Rohrzucker mit Potter-Elvehjem-Homogenisator mit Teflon-Stempel, zentrifugiert 30 min bei 20 000 g, im Überstand das Enzym mit Ammonsulfat (50–65% Sättigung) gefällt, 20 000 g-Partikelfraktion („Mitochondrien“) gewaschen, mit Messerhomogenisator (Ultra-Turrax) in 0,05 M Phosphatpuffer extrahiert, zentrifugiert, Enzym gefällt mit Ammonsulfat (50–65% Sättigung). Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit 20 bis 40 sec nach Start in 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,0 bei 25 °C. Bei Präparationen aus dem Flußkrebs *Orconectes limosus* erhielten wir so folgende spezifische Aktivitäten ($\mu\text{Mol/mg Protein} \cdot \text{min}$): 6,5 (Schwanzmuskel-Überstand); 12,0 (Schwanzmuskel-Mitochondrien); 260 (Herz-Mitochondrien); gegenüber dem Gesamthomogenat Reinigungen um den Faktor 6 (Schwanzmuskel-Überstand) bis 20 (Herz-Mitochondrien). Nach 10 min Präinkubation¹ hemmten $3 \cdot 10^{-5}$ M DL-Thyroxin die Malatdehydrogenase aus Gesamthomogenaten (Ammonsulfatfällung 30–65% Sättigung) von *Apis mellifica*, *Chironomus*-Larven, *Orconectes*-Schwanzmuskel, *Tubifex* und Spinatblättern um 15 bis 40 Prozent. Im Lineweaver-Burk-Plot erwies sich diese Hemmung als gemischt bis kompetitiv. Die bei diesen Enzympräparationen benötigten Thyroxin-Konzentrationen liegen weit über denen, die für die MDH aus Schweineherz benötigt werden¹. Dies beruht jedoch nicht auf einem Unterschied in den Enzymen,

sondern auf der unterschiedlichen Konzentration der Begleitproteine. In Fig. 1 sind die Konzentrationen an DL-Thyroxin, die für 50% Hemmung des Enzyms aus Flußkrebs- und Säuger-Präparationen benötigt wer-

Abb. 1. Abhängigkeit der für 50% Hemmung der Malatdehydrogenase benötigten Konzentration DL-Thyroxin von der Proteinkonzentration im Ansatz. Enzympräparationen aus: ○ Krebsherz-Mitochondrien; ● Schweineherz-Mitochondrien; △ Krebsschwanzmuskel-Mitochondrien; □ Krebsschwanzmuskel-Überstand; ■ Rattenskelettmuskel-Überstand.

den, aufgetragen gegen die Proteinkonzentration. Im Bereich von 0,026 bis 20 $\mu\text{g Protein/ml}$ erhält man für alle Enzympräparationen gemeinsam eine Gerade. Die berechnete Ausgleichsgerade schneidet die Ordinate bei $3 \cdot 10^{-6}$ M, dieser Schnittpunkt ist jedoch nicht signifikant von 0 verschieden. Aus der Tatsache, daß sich mit Werten von Säugerenzymen und Krebsenzymen eine gemeinsame Gerade ergibt, schließen wir, daß die Krebs-MDH die gleiche Empfindlichkeit gegen Thyroxin besitzt wie die MDH von Säugern. Bei einigen Proteinkonzentrationen bestimmten wir im Diagramm $[1/v]$ gegen $[I]$ mit verschiedenen Substratkonzentrationen die scheinbaren Hemmkonstanten für DL-Thyroxin. Diese liegen bei 0,14 $\mu\text{g Protein/ml}$ (Schweineherz-Mitochondrien) in guter Übereinstimmung mit l. c.¹ bei $1,5 \cdot 10^{-6}$ M; mit 0,93 $\mu\text{g Protein/ml}$ jedoch bei $6 \cdot 10^{-6}$ (Krebs-Herzmitochondrien und Krebs-Schwanzmuskel-Mitochondrien); mit 0,026 $\mu\text{g Protein/ml}$ bei nur $1 \cdot 10^{-6}$ M (Krebsherz-Mitochondrien). Die hohe Affinität der Begleitproteine zu Thyroxin, und die dagegen offenbar nicht bedeutend höhere Affinität des Enzyms zum Hormon scheint uns gegen eine spe-

¹ J. WOLFF and E. C. WOLFF, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 26, 387 [1957].

stoffe aufgefunden. Bei diesen handelt es sich weitgehend um natürlich vorkommende Verbindungen und Stoffwechselprodukte. Zur Aufarbeitung wurden die Bananen der Sorte Gros Michel, etwa 10 Tage nach dem Maximum der Atmung (Lagertemperatur +15 °C), was einem Maximum gewisser Aromakomponenten entspricht, mit Methanol homogenisiert. Der Preßsaft des Homogenats wurde mit Pentan/Methylenchlorid (2/1) extrahiert und nach schonendem Einengen die Komponenten auf verschiedenen Trennsäulen präparativ angereichert. Die weitere Trennung und Identifizierung

erfolgte auf Mikropack bzw. Kapillarsäulen teilweise in Kopplung mit einem Massenspektrometer. Zusätzliche Identifizierung wurde durch Retentionsvergleiche, chemische Ausscheidungsanalyse und IR-Mikrotechnik erzielt.

Von den bisher ca. 350 gaschromatographisch getrennten Komponenten konnten die angegebenen 183 Verbindungen identifiziert werden.

Möglicherweise sind einige Methylester auf die Aufarbeitung mit Methanol zurückzuführen.

Malatdehydrogenasen unterschiedlicher Herkunft: Hemmung durch Thyroxin

K. GRASZYNSKI, D. SIEBERS, I. TOFAUTE und I. BRUNNER

II. Zoologisches Institut, Freie Universität Berlin

(Z. Naturforschg. **24 b**, 783–784 [1969]; eingegangen am 13. März 1969)

Schweineherz-Malatdehydrogenase wird durch L-Thyroxin weit stärker gehemmt als andere Dehydrogenasen und zwar bereits bei physiologischen Thyroxin-Konzentrationen¹. Im Hinblick auf die Annahme, daß dies eine Primärwirkung des Hormons auf den Stoffwechsel darstellt, scheinen uns die folgenden Beobachtungen an Malatdehydrogenasen unterschiedlicher Herkunft interessant.

Die Enzympräparationen wurden folgendermaßen gewonnen: Homogenisiert in 0,25 M Rohrzucker mit Potter-Elvehjem-Homogenisator mit Teflon-Stempel, zentrifugiert 30 min bei 20 000 g, im Überstand das Enzym mit Ammonsulfat (50–65% Sättigung) gefällt, 20 000 g-Partikelfraktion („Mitochondrien“) gewaschen, mit Messerhomogenisator (Ultra-Turrax) in 0,05 M Phosphatpuffer extrahiert, zentrifugiert, Enzym gefällt mit Ammonsulfat (50–65% Sättigung). Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit 20 bis 40 sec nach Start in 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,0 bei 25 °C. Bei Präparationen aus dem Flußkrebs *Orconectes limosus* erhielten wir so folgende spezifische Aktivitäten ($\mu\text{Mol/mg Protein} \cdot \text{min}$): 6,5 (Schwanzmuskel-Überstand); 12,0 (Schwanzmuskel-Mitochondrien); 260 (Herz-Mitochondrien); gegenüber dem Gesamthomogenat Reinigungen um den Faktor 6 (Schwanzmuskel-Überstand) bis 20 (Herz-Mitochondrien). Nach 10 min Präinkubation¹ hemmten $3 \cdot 10^{-5}$ M DL-Thyroxin die Malatdehydrogenase aus Gesamthomogenaten (Ammonsulfatfällung 30–65% Sättigung) von *Apis mellifica*, *Chironomus*-Larven, *Orconectes*-Schwanzmuskel, *Tubifex* und Spinatblättern um 15 bis 40 Prozent. Im Lineweaver-Burk-Plot erwies sich diese Hemmung als gemischt bis kompetitiv. Die bei diesen Enzympräparationen benötigten Thyroxin-Konzentrationen liegen weit über denen, die für die MDH aus Schweineherz benötigt werden¹. Dies beruht jedoch nicht auf einem Unterschied in den Enzymen,

sondern auf der unterschiedlichen Konzentration der Begleitproteine. In Fig. 1 sind die Konzentrationen an DL-Thyroxin, die für 50% Hemmung des Enzyms aus Flußkrebs- und Säuger-Präparationen benötigt wer-

Abb. 1. Abhängigkeit der für 50% Hemmung der Malatdehydrogenase benötigten Konzentration DL-Thyroxin von der Proteinkonzentration im Ansatz. Enzympräparationen aus: ○ Krebsherz-Mitochondrien; ● Schweineherz-Mitochondrien; △ Krebsschwanzmuskel-Mitochondrien; □ Krebsschwanzmuskel-Überstand; ■ Rattenskelettmuskel-Überstand.

den, aufgetragen gegen die Proteinkonzentration. Im Bereich von 0,026 bis 20 $\mu\text{g Protein/ml}$ erhält man für alle Enzympräparationen gemeinsam eine Gerade. Die berechnete Ausgleichsgerade schneidet die Ordinate bei $3 \cdot 10^{-6}$ M, dieser Schnittpunkt ist jedoch nicht signifikant von 0 verschieden. Aus der Tatsache, daß sich mit Werten von Säugerenzymen und Krebsenzymen eine gemeinsame Gerade ergibt, schließen wir, daß die Krebs-MDH die gleiche Empfindlichkeit gegen Thyroxin besitzt wie die MDH von Säugern. Bei einigen Proteinkonzentrationen bestimmten wir im Diagramm $[1/v]$ gegen $[I]$ mit verschiedenen Substratkonzentrationen die scheinbaren Hemmkonstanten für DL-Thyroxin. Diese liegen bei 0,14 $\mu\text{g Protein/ml}$ (Schweineherz-Mitochondrien) in guter Übereinstimmung mit l. c.¹ bei $1,5 \cdot 10^{-6}$ M; mit 0,93 $\mu\text{g Protein/ml}$ jedoch bei $6 \cdot 10^{-6}$ (Krebs-Herzmitochondrien und Krebs-Schwanzmuskel-Mitochondrien); mit 0,026 $\mu\text{g Protein/ml}$ bei nur $1 \cdot 10^{-6}$ M (Krebsherz-Mitochondrien). Die hohe Affinität der Begleitproteine zu Thyroxin, und die dagegen offenbar nicht bedeutend höhere Affinität des Enzyms zum Hormon scheint uns gegen eine spe-

¹ J. WOLFF and E. C. WOLFF, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **26**, 387 [1957].

3,4-tetrahydronaphthylessigsäureäthylester (**4**) in 62% Ausbeute (Schmp. 74–76° aus Äther/Petroläther). Da eine Dehydrierung von **4** mit Palladium/Kohle keine definierten Produkte lieferte, wurde **4** zunächst durch 5 Min. Erhitzen in wasserfreier Ameisensäure bei 100° dehydratisiert und das aus zwei, sich wahrscheinlich in der Lage der neu entstandenen Doppelbindung unterscheidenden Verbindungen bestehende Reaktionsprodukt durch 1-stdg. Erhitzen mit Schwefel auf 200–210° dehydriert. Die Ausbeute an 5-Acetoxy-6-methoxy-1-naphthylessigsäureäthylester (**5**) (Schmp. 98° aus Äther/Petroläther) betrug nach Reinigung des Reaktionsgemisches durch präparative Schichtchromatographie in Benzol/Methanol 95:5 48% der Theorie. Die Verbindung zeigte folgendes UV-Spektrum: $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 230 nm (4,70), 273 nm (3,71), 284 nm (3,74), 299 nm (3,65), 323 nm (3,29) und 336 nm (3,35). **5** wurde durch 2-stdg. Erhitzen auf 80° in 2 N Natronlauge unter Stickstoff zur 5-Hydroxy-6-methoxy-1-naphthylessigsäure (**6**) verseift. Die aus Äther/Petroläther in farblosen Nadeln (Schmp. 203–205°) kristallisierende Säure färbte sich an der Luft bald braun.

6 erwies sich bei der Dünnschichtchromatographie in Benzol/Aceton, Methanol/Eisessig 90:5:2:2 mit $R_f = 0,33$ als deutlich verschieden von der 5-Hydroxy-1-naphthylessigsäure ($R_f = 0,27$) **6** konnte also nicht das vermutete zweite Stoffwechselprodukt sein, da das damals untersuchte Produkt chromatographisch einheitlich war.

Da mit dem in l. c.² erwähnten UV-Spektrum auch die 5,6-Dihydroxy-1-naphthylessigsäure vereinbar schien, wurde sie ebenfalls synthetisiert. Aus 2,3-Dimethoxyhydrozimtsäure⁵ wurde wie bei **2** angegeben die γ -(2,3-Dimethoxyphenyl)-buttersäure dargestellt (Ausb. 86%, Schmp. 60°) und diese wie vorher über das Säurechlorid mit SnCl_4 in das 5,6-Dimethoxy-1-

tetralon übergeführt (Ausb. 97%, Schmp. 105° aus Äther/Petroläther). Reformatzki-Reaktion und direkte Dehydrierung mit Palladium/Aktivkohle bei 300° unter CO_2 ergab nach Reinigung des Reaktionsproduktes durch präparative Schichtchromatographie in Benzol/Methanol 99:1 und alkalischer Verseifung des öligen Äthylesters die 5,6-Dimethoxy-1-naphthylessigsäure in 45% Ausbeute (Schmp. 123–125° aus Äther/Petroläther). UV-Spektrum: $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 233 nm (4,72), 288 nm (3,74), 299 nm (3,71), 327 nm (3,38) und 338 nm (3,40). Abspaltung der Methylgruppen durch 2-stdg. Erhitzen mit 22-proz. HBr in 50-proz. Essigsäure auf 110° ergab die 5,6-Dihydroxy-1-naphthylessigsäure (Schmp. 205–208°) in 50% Ausbeute.

Auch diese Säure erwies sich bei der Dünnschichtchromatographie mit $R_f = 0,15$ in dem o. a. System als verschieden von dem Hauptstoffwechselprodukt.

Wir untersuchten deshalb eine neu aus Weizenkeimlingen isolierte Probe der 5-Hydroxy-1-naphthylessigsäure im Massenspektrometer. Außer den Massenpeaks der synthetisch hergestellten Vergleichsprobe (Molekül- in m/e 202) trat nur eine sehr schwache Gruppe von peaks bei m/e 502 auf, für die keine Erklärung gegeben werden kann. Zwischen diesen peaks und m/e 502 konnten keine weiteren Ionen beobachtet werden, so daß eine weitere Substitution der 5-Hydroxysäure durch einfache Sauerstoff-Funktionen unwahrscheinlich ist.

Alle neu synthetisierten Verbindungen wurden durch Elementaranalyse sowie durch IR- und NMR-Spektren charakterisiert. In allen Fällen wurde die mit der Summenformel übereinstimmende Zusammensetzung gefunden und konnten die auf Grund der angegebenen Strukturen zu erwartenden Absorptionen beobachtet werden.

Der eine von uns (V. U. A.) dankt dem DAAD für ein Stipendium. Herrn Dr. H.-D. KLÄMBT danken wir für die Isolierung der 5-Hydroxy-1-naphthylessigsäure, Herrn Dr. H.-W. FEHLHABER für die Aufnahme des Massenspektrums.

⁵ H. V. KRANNICHFELDT, Ber. dtsch. chem. Ges. **46**, 4023 [1913].

Wirkung einiger Lokalanästhetika auf *Nitella*

OTTO-ERICH SCHULTZ

Pharmazeutisches Institut, Universität Kiel

ULF-PETER HANSEN und KURT VANSELOW

Institut für Angewandte Physik, Universität Kiel

(Dir.: Prof. Dr. W. KROEBEL)

(Z. Naturforsch. **24 b**, 785–786 [1969]; eingegangen am 1. April 1969)

Die großen Internodienzellen der Süßwasseralge *Nitella flexilis* zeigen wie Nervenfasern als Folge eines Reizes (elektrischer Strom, mechanische Beanspruchung, Licht, Bestrahlung u. a.) Aktionspotentiale. Die Ruhespannung ist bei beiden Objekten eine Kaliumdiffu-

sions-Spannung, jedoch besteht ein Unterschied außer im Zeitmaßstab darin, daß das Aktionspotential bei den Algenzellen nicht auf einen Einstrom von Na^+ -Ionen, sondern auf einen Ausstrom von Cl^- -Ionen zurückzuführen ist^{1, 2}.

Insofern erscheinen die Ergebnisse der Untersuchungen bemerkenswert, die in Abb. 1 dargestellt sind. Die Lokalanästhetika Xylocain (0,04%), Butacain (0,08%) und Baycain (0,08%) beeinflussen den Erregungsmechanismus bei den angegebenen Konzentrationen in der Badflüssigkeit bei *Nitella* in ähnlicher Weise wie den der Nervenfaser. Abb. 1 a zeigt, daß die genannten Lokalanästhetika den temporären Einwärtsstrom, der bei *Nitella* von Anionen getragen wird, ähnlich dem der Nervenfaser, der von Kationen getragen wird, ver-

¹ C. T. GAFFEY and L. J. MULLINS, J. Physiol. [London] **144**, 505 [1958].

² A. B. HOPE and G. P. FINDLAY, Pland & Cell Physiol. **5**, 377 [1964].