These results can be best interpreted in terms of a slow rotation around the N—S bond on the nmr time-scale.

The free energy of activation for rotation around the N—S bond in the chlorides (**3a**) and (**3c**) was determined by the dynamic nmr method⁸. The data are given in the Table 2.

Com- pound	$\Delta\nu$ [Hz]	T_c [°]	K_c [sec ⁻¹]	$G^\ddagger$ [kcal · mol ⁻¹]
3a	3.9	— 39	8.1	12.5 ± 0.4
3c	3.6	— 17	8.8	13.0 ± 0.4

Table 2. Free energy barriers for conformational interchange in dialkylaminosulphinyl chlorides (the spectra were recorded with a Joel spectrometer at 60 MHz in CH₂Cl₂ solution with the aid of a variable temperature accessory).

The nature of the restricted rotation in dialkylaminosulphinyl chlorides (**3**) is under investigation.

Dimethylaminosulphinyl chloride (**3a**) was prepared from O-ethyl *N,N*-dimethylamidodisulphite and thionyl chloride¹²; b.p. 30°/0.2 mmHg, n_D^{20} 1.4960 (l.c.¹³ 43–45°/0.3 mmHg). The chlorides (**3b**) and (**3c**) were synthesized directly from the corresponding amines and thionyl chloride¹³; **3b**: b.p. 62°/0.6 mmHg, n_D^{20} 1.5165; **3c**: b.p. 75–76°/0.4 mmHg, semisolid compound at room temperature.

Note added in proof: After this paper was submitted for publication, the magnetic nonequivalence of the methyl groups in isopropylsulphinyl chloride was reported by G. CANALINI, G. MACCAGNANI and F. TADDEI, *Tetrahedron Letters* [London] **1971**, 3035.

¹² G. ZINNER and W. KÖLLING, *Naturwissenschaften* **46**, 354 [1959].

¹³ G. WEISS and G. SCHULZE, *Pat.Ger.*, 1, 150, 994 (July 4, 1963); *C. A.* **60**, 2956 [1964].

Reinigung einer „Pseudo“-Cholinesterase aus der Hämolymphe von *Helix pomatia*

Purification of a Pseudo-Cholinesterase from the Haemolymph of *Helix pomatia*

R. VOIGTMANN und G. UHLENBRUCK

Medizinische Universitätsklinik Köln-Lindenthal
(Direktor: Prof. Dr. R. GROSS)

(*Z. Naturforsch.* **26 b**, 1374–1375 [1971]; eingeg. am 24. September 1971)

Das Vorkommen „echter“ Acetylcholinesterasen und auch sogenannter „Pseudo“-Cholinesterasen in Schnecken und Avertebraten ist schon länger bekannt^{1–3}. Da diese Enzyme in verschiedenen Organen dieser Tiere nachgewiesen worden sind^{1,3,4}, erscheinen vergleichende Studien dieser Varianten besonders reizvoll⁵. Voraussetzung für eine solche Untersuchung ist die Reindarstellung dieser Enzyme. Nachdem wir kürzlich im Eiweißdrüsensekret von *Helix pomatia*⁴ eine Pseudocholinesterase nachweisen und teilweise gereinigt anreichern konnten, beschreibt die vorliegende Arbeit die Reindarstellung eines solchen Enzyms aus der Hämolymphe dieser Schnecken.

Hierzu wurde die Hämolymphe durch Punktion der großen Gefäße gewonnen. Eine erste Reinigung des Enzyms erfolgte mittels Anionenaustausch-Chromatographie und Gel-Filtration. Mittels Disk-Elektrophorese wurden die verschiedenen Fraktionen überprüft. Die Enzymaktivität bestimmten wir abgesehen von kleine-

ren Modifikationen nach der von ELLMAN⁶ angegebenen Methode, wobei Acetylthiocholinjodid und Butyrylthiocholinjodid als Substrate eingesetzt wurden. Als Maß für die Enzymmenge bei den einzelnen Chromatographieschritten diente der Substratumsatz in μ Mol pro Min. durch 0,1 ml Enzym-Lösung bei konstantem Reaktionsvolumen. Für nähere Einzelheiten über die Enzymbestimmung, Chromatographie und Disk-Elektrophorese verweisen wir auf die vorhergehende Arbeit⁴.

Nach ausgiebiger Dialyse der Hämolymphe gegen 0,02 M Phosphatpuffer pH 7,9 über 48 Std. bei 4°C erfolgte der erste Reinigungsschritt über eine DEAE-Cellulose-Säule (60 cm × 1,5 cm; Serva, Heidelberg). 6 ml Hämolymphe wurden durch einen linear ansteigenden NaCl-Gradienten in 0,02 M Phosphatpuffer pH 7,9 bei einer Flußrate von 18 ml/Stde. und einem Fraktionsvolumen von 2 ml eluiert. Das Chromatogramm ist in Abb. 1 oben dargestellt; hierbei wurde das Enzym schon bei relativ geringer Ionenstärke von der DEAE-Cellulose desorbiert.

Der Befund, daß sich in den Fraktionen 55–80 eine große Enzymmenge befindet, aber keine Absorption bei 280 nm festzustellen ist, war bemerkenswert. Dies könnte auf ein Glykoprotein mit großem Kohlenhydratanteil oder aber auf ein Protein mit sehr geringen Mengen an aromatischen Aminosäuren hindeuten. In der Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese bei einer Acrylamidkonzentration von 7,0% und einem pH von 9,5 stellen sich die eingeeengten Fraktionen 55–80 in

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. G. UHLENBRUCK, Med. Universitätsklinik Köln, Abt. f. Immunbiologie, D-5000 Köln 41, Kerpener Str. 15.

¹ G. A. KERKUT and G. A. COTTRELL, *Comp. Biochem. Physiol.* **8**, 53 [1963].

² P. C. EMSON and G. A. KERKUT, *Comp. Biochem. Physiol.* **39 B**, 879 [1971].

³ K. B. AUGUSTINSSON, *Biochem. J.* **40**, 343 [1946].

⁴ R. VOIGTMANN u. G. UHLENBRUCK, *Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.*, in press.

⁵ K. B. AUGUSTINSSON, *Bull. Wld. Hlth. Org.* **44**, 81 [1971].

⁶ G. L. ELLMAN, D. COURTNEY, V. ANDRES, and F. M. FEATHERSTONE, *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88 [1961].

Abb. 1. Oben: Chromatogramm von 6 ml Hämolymphe über DEAE-Cellulose (60 cm $\times$ 1,5 cm), Elution mit linear ansteigendem NaCl-Gradienten in 0,02 M Phosphatpuffer pH 7,9 x—x—x, Extinktion des Eluates bei 280 nm ●—●—●, Enzymmenge in 0,1 ml Enzym-Lösung gemessen als Substratumsatz pro Minute — — —, Flußrate 18 ml/Stunde. Unten: Gel-Filtration der eingeeengten Fraktionen 55–80 nach Anionenaustauschchromatographie (3 ml) über Sephadex G 200 (60 cm $\times$ 1,5 cm), Elution mit 0,02 M Phosphatpuffer pH 7,9, Extinktion des Eluates bei 210 nm ●—●—●, Enzymmenge in 0,1 ml Enzym-Lösung gemessen als Substratumsatz pro Min. — — —, Flußrate 16 ml/Stde., Fraktionsvolumen 2 ml.

drei Banden dar; zwei weit zur Anode gewanderte und eine nahe an der Kathode gelegene. Dieser Befund

rechtfertigte einen weiteren Reinigungsversuch durch Gel-Filtration über Sephadex G 200 (Pharmacia, Uppsala, Schweden). Abb. 1, unten, zeigt das Chromatogramm der konzentrierten Fraktionen 55–80 über Sephadex G 200 (60 cm $\times$ 1,5 cm) bei einer Flußrate von 16 ml/Stunde. Zur Identifizierung der Proteine wurde die Extinktion des Eluates bei 210 nm gemessen. Ähnlich wie in der Disk-Elektrophorese lassen sich auch hier deutlich drei große Fraktionen unterscheiden, wobei die Enzymaktivität streng auf die erste beschränkt bleibt, was für die gelungene Reinigung des Enzyms spricht. Untermuert wurde diese Vermutung durch eine einzige einheitliche Bande in der Disk-Elektrophorese nach Anfärben mit Amidol, die nahe der Kathode lag. Die beiden zur Anode gewanderten Banden waren verschwunden.

Das Enzym zeigte den gleichen Substratumsatz pro Minute gegenüber Acetylthiocholinjodid wie gegenüber Butyrylthiocholinjodid, wonach es eindeutig in die Gruppe der Pseudocholinesterasen einzuordnen ist. Wie alle Cholinesterasen wurde es durch Prostigmin® gehemmt, so daß ein unspezifischer Esteraseeffekt auf die angebotenen Substrate ausgeschlossen werden konnte. Die fehlende Absorption der Enzym-Lösung bei 280 nm sowie die fehlende Retention des Enzyms im Sephadex-Gel, was auf ein Molekulargewicht von über 200 000 schließen läßt — der letztere Befund wird auch durch die Lokalisation der Enzymbande in der Disk-Elektrophorese gestützt —, stellen weitere Charakteristika des gereinigten Enzyms dar. Weiteren Untersuchungen muß es vorbehalten bleiben, die Enzymkinetik der Varianten aus den verschiedenen Organen untereinander zu vergleichen, die pH-Abhängigkeit, den Einfluß von Ionen auf die Aktivität, die Substratspezifität zu prüfen und eine chemische Analyse der gereinigten Enzyme durchzuführen.

Die Untersuchungen wurden durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft ermöglicht. Wir danken Frau E. JÖRGES und Frau H. MEYER für ihre geschickte Mitarbeit.