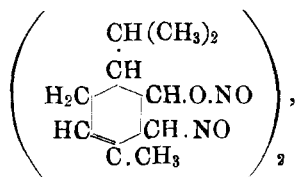


und setzt Kaliumpermanganat hinzu, so wird es äusserst leicht oxydirt, eine Erscheinung, welche hier eine doppelte Bindung voraussetzen würde.

Selbstverständlich können wir für das Normalphellandrennitrit ev. auch eine Formel



ebenso eine entsprechende für das Pseudophellandrennitrit annehmen; der obigen Reactionen wegen möchte ich jedoch eher eine endständige Anlagerung annehmen. Die Untersuchung hierüber wird fortgesetzt, ebenso die Trennung der Nitrite.

Zusammenfassung.

Das Rohphellandren des Eucalyptusöls besteht aus zwei Phellandrenen, aus dem Normal- und dem Pseudo-Phellandren mit den oben angegebenen Constitutionen; beide enthalten je zwei doppelte Bindungen. Auch hier zeigte es sich wieder, dass neben dem Normal-Terpen fast stets als Begleiter die Pseudoform vorkommt. Beide Phellandrene geben dasselbe Dihydro-Phellandren.

Bei der Aboxydation mit Kaliumpermanganat unter guter Kühlung erhält man quantitativ zwei α -Oxysäuren, welche, mit Bleisuperoxyd weiter oxydirt, active Isopropyl-bernsteinsäure und α -Isopropylglutarsäure liefern.

Dem Normal- sowie dem Pseudo-Phellandren entspricht ein Nitrit.

313. A. Bach und R. Chodat: Untersuchungen über die Rolle der Peroxyde in der Chemie der lebenden Zelle.

VI. Ueber Katalase¹⁾.

(Eingegangen am 15. Mai 1903; mitgeth. i. d. Sitzung v. Hrn. C. Neuberg.)

Zwischen der Peroxydase und der Katalase, welche in fast allen Antheilen des Thier- und Pflanzen-Körpers gleichzeitig vorkommen, besteht ein scheinbarer Antagonismus, indem Erstere Hydroperoxyd activirt, während Letztere dasselbe unter Entwicklung von inertem Sauerstoff sehr rasch und völlig zersetzt. Löw²⁾, welcher die Indivi-

¹⁾ Vergl. diese Berichte 35, 1275, 2465, 3943 [1902]; 36, 600, 606 [1903].

²⁾ U. S. Dept. of Agriculture, Rep. 68 [1901].

dualität der Katalase zuerst festgestellt hatte, glaubt im Hinblick auf die ausserordentliche Thätigkeit dieses Enzyms dem Hydroperoxyd jede weitere physiologische Bedeutung absprechen zu müssen. Diese Ansicht erscheint uns aber nicht ganz berechtigt, da Löw die gleichzeitige Einwirkung von Peroxydase und Katalase auf Hydroperoxyd nicht ermittelte. Es ist also noch nicht bewiesen, dass die Katalase die Verwerthung des Hydroperoxyds für Oxydationszwecke durch die Vermittelung der Peroxydase verhindert. Man darf weiter nicht ausser Acht lassen, dass bei der freiwilligen Oxydation von leicht oxydablen Körpern nicht nur Hydroperoxyd, sondern auch substituirte Hydroperoxyde primär entstehen, welche durch die Peroxydase, ebenso wie Hydroperoxyd, activirt werden. Ob nun die Katalase auch diese Peroxyde unter Entwicklung von molekularem Sauerstoff zersetzt, ist ebenfalls noch nicht erforscht worden. Es erschien uns daher erforderlich, das Verhalten der Katalase gegen substituirte Hydroperoxyde einerseits, gegen Hydroperoxyd in Gegenwart von Peroxydase andererseits auf experimentellem Wege festzustellen. Die von uns ausgeführten Versuche scheinen weiteres Licht auf das ziemlich verwickelte Problem der Oxydationsfermente zu werfen.

Die für diese Versuche angewandte Katalase wurde aus Reinculturen von *Sterigmatocystis nigra* in der Weise dargestellt, dass die Pilzhäute mit Glas zu einem Brei zerstoßen und mit einer Spur Natronlauge enthaltendem Wasser verrieben wurden. Die klar filtrirte Flüssigkeit wurde mit Alkohol gefällt und dann in üblicher Weise gereinigt. Wie in unserer I. Mittheilung angegeben wurde, vermochte dieser Pilz über 1 pCt. Hydroperoxyd zu ertragen. Bei weiteren Versuchen konnten wir durch methodische Züchtung schöne Culturen von *Sterigmatocystis nigra* in Nährflüssigkeiten erzeugen, welche noch über 2 pCt. Hydroperoxyd enthielten. In Uebereinstimmung mit der von Löw¹⁾ gemachten Annahme nach welcher die in der Zeiteinheit in die Zellen der Pilze eindringende Hydroperoxydmenge durch die Katalase zerstört wird, erwies sich *Sterigmatocystis nigra* sehr stark katalasehaltig. Für gleiche Gewichtstheile Trockensubstanz vermag dieser Pilz etwa viermal so viel Hydroperoxyd wie *Penicillium glaucum* zu zersetzen.

Die von uns dargestellte Katalase war physiologisch rein, d. h. enthielt keine anderen Enzyme, und war frei von reducirenden Substanzen, was für Oxydationsversuche von grosser Wichtigkeit ist.

Um die Einwirkung der Katalase auf substituirte Hydroperoxyde zu verfolgen, wählten wir als Vertreter dieser Körperklasse das wohldefinierte, dem Hydroperoxyd am nächsten stehende Aethylhydro-

¹⁾ Diese Berichte 35, 2487 [1902].

peroxyd, $C_2H_5.O.OH$, welches von Baeyer und Villiger¹⁾ vor zwei Jahren zuerst dargestellt worden ist.

100 g Diäthylsulfat wurden mit 115 g 30-procentiger Hydroperoxydlösung, 175 g Kaliumhydroxyd und 600 ccm Wasser bis zum Verschwinden des Diäthylsulfats geschüttelt, und das angesäuerte Reactionsproduct aus dem Luftbade überdestillirt. Nach zweimaligem Ueberdestilliren unter vermindertem Drucke ergab das erhaltene Product (265 g) bei der jodometrischen Bestimmung 2.47 pCt. Aethylhydroperoxyd. Mit dem Titanschwefelsäurereagens gab es nicht die mindeste Gelbfärbung; es war also völlig hydroperoxydfrei. Es euthielt neben viel Alkohol eine Spur Essigsäure.

30 ccm 2.47-procentige, genau neutralisirte Aethylhydroperoxydlösung wurden mit 0.01 g Katalase in einem Apparat, welcher das Auffangen und Messen des entwickelten Sauerstoffs gestattete, versetzt. Aus einer gleichen Menge Hydroperoxydlösung mit entsprechendem Gehalt an activem Sauerstoff hätte die Katalase etwa 120 ccm Sauerstoff binnen wenigen Minuten entwickeln müssen. Aus dem Aethylhydroperoxyd wurde aber auch nach längerem Stehenlassen unter häufigem Umschütteln keine einzige Gasblase erhalten. Der Versuch wurde mit verschiedenen Katalasepräparaten wiederholt, aber stets mit demselben Erfolg. Wir versetzten sogar 30 ccm Aethylhydroperoxydlösung mit 2 g lufttrocknem Sterigmatocystis-Pulver, ein Quantum, welches aus hinreichenden Hydroperoxydmengen literweise Sauerstoff entwickeln würde. Aber auch hier fand keine Sauerstoffentwicklung statt.

Aus diesen Versuchen muss geschlossen werden, dass die Katalase nicht im Stande ist, Aethylhydroperoxyd unter Sauerstoffentwicklung zu zersetzen. Was nun für das dem Hydroperoxyd am nächsten stehende Aethylhydroperoxyd gilt, kann auf andere substituirte Hydroperoxyde, deren Radicale dem Wasserstoff-Atom vom functionellen Standpunkte weniger ähnlich sind als die C_2H_5 -Gruppe, ohne Weiteres übertragen werden. In der That wird die Oxygenase, welche als ein monosubstituirtes Hydroperoxyd anzusehen ist²⁾, durch die Katalase nicht im Mindesten angegriffen. Wir überzeugten uns davon durch quantitative Oxydationsversuche.

Da die Oxygenase verhältnissmässig langsam und nur dann Sauerstoff aufnimmt, wenn sie denselben an eine oxydable Substanz abgeben kann, so lag hier für die directe Constatirung einer eventuellen Sauerstoffentwicklung unter dem Einflusse der Katalase keine Aussicht vor. Wir stellten daher vergleichende Oxydationsversuche mit Gemengen von Oxygenase und Peroxydase in Gegenwart und in Abwesenheit von Katalase an und bestimmten in jedem Falle den absorbirten Sauerstoff. Als oxydable Substanz benutzten wir Pyrogallol. Die Versuche wurden in zwei Apparaten, wie in der IV. Mittheilung³⁾

¹⁾ Diese Berichte 34, 738 [1901].

²⁾ Diese Berichte 35, 2465 [1902].

³⁾ Diese Berichte 36, 600 [1903].

angegeben worden ist, gleichzeitig ausgeführt. In die Behälter wurden je 1 g Pyrogallol und 30 ccm einer Lösung, welche 0.01 g Lactarius-Oxygenase und 0.01 g Meerrettig-Peroxydase enthielt, gegeben.

In den Behälter A wurde noch 0.01 g Katalase eingetragen, während Behälter B keinen Zusatz erhielt. Binnen 48 Stunden wurden folgende Sauerstoffmengen absorbiert:

	Absorbirter Sauerstoff	
	A (mit Katalase)	B (ohne Katalase)
Nach 5 Stunden	6.2 ccm	6.2 ccm
» 10 »	9.4 »	9.3 »
» 24 »	14.8 »	14.8 »
» 48 »	18.6 »	18.7 »

Die Anwesenheit von Katalase übt also auf die Oxydationsleistung der Oxygenase keinen hemmenden Einfluss aus.

Anders dürften sich die Verhältnisse bei Gemengen von Peroxydase und Hydroperoxyd gestalten, da Letzteres durch die Katalase ungemein rasch unter Entwicklung von inertem Sauerstoff zersetzt wird. Wir fanden aber, dass auch hier die Katalase auf die Oxydationsleistung des Systems Peroxydase-Hydroperoxyd ohne Einwirkung ist.

Die Versuche wurden, wie in der IV. Mittheilung beschrieben, auf colorimetrischem Wege mit Guajactinctur, Pyrogallol und Anilin ausgeführt. Es ergab sich dabei, dass zwischen den mit Katalase versetzten und katalasefreien Proben kein Färbungsunterschied wahrnehmbar war. Zu bemerken ist, dass für diese Versuche möglichst reine Katalase angewandt werden muss, da die Anwesenheit von reducirenden Substanzen auf die Färbungsreactionen störend wirkt.

Die Thatsache, dass die durch Gemenge von Peroxydase und Oxygenase bzw. Hydroperoxyd hervorgerufenen Oxydationsprocesse durch die Katalase nicht gestört werden, war anscheinend am einfachsten durch die von uns in der I. Mittheilung gemachte vorläufige Annahme erklärbar, nach welcher die Katalase unter dem vereinigten Einflusse der Peroxydase und des Hydroperoxyds vernichtet werden soll. Genaue Versuche ergaben aber, dass dies keineswegs der Fall ist.

20 ccm einer 0.05-procentigen Katalaselösung wurden mit 0.01 g Oxygenase und 0.01 g Peroxydase versetzt und über Nacht stehen gelassen. Am folgenden Morgen wurden dem Gemisch 5 ccm 3-procentiger Hydroperoxydlösung zugegeben, der entweichende Sauerstoff aufgefangen und gemessen. Binnen 3 Minuten wurden 36.8 ccm Sauerstoff entwickelt. Ein Controlversuch mit 20 ccm derselben Katalaselösung und 5 ccm Hydroperoxydlösung ergab 37.2 ccm Sauerstoff.

20 ccm Katalaselösung wurden mit 0.01 g Peroxydase und 5 ccm 3-procentiger Hydroperoxydlösung versetzt.

Entwickelt binnen 3 Minuten . . . 37.1 ccm Sauerstoff,
 Controllversuch (ohne Peroxydase): 37.4 » » .

Aus sämmtlichen, oben angegebenen Versuchen geht mit voller Klarheit hervor, dass die Peroxydase und die Katalase gleichzeitig vorkommen und fungiren können, ohne dass sie sich bei der Ausübung ihrer specifischen Functionen gegenseitig stören. Auf substituirte Hydroperoxyde, welche durch die Peroxydase activirt werden, ist die Katalase überhaupt ohne Einwirkung. Was das Hydroperoxyd betrifft, so wird bei der gleichzeitigen Einwirkung von Peroxydase und Katalase nur derjenige Antheil des Peroxyds durch Letztere unter Sauerstoffentwicklung zersetzt, welcher durch Erstere für Oxydationszwecke nicht in Anspruch genommen wird. Andererseits wird Katalase durch Gemenge von Peroxydase und Hydroperoxyd nicht mehr geschädigt als durch Hydroperoxyd allein. Unsere oben erwähnte, vorläufige Annahme, die indessen uns zur Kenntniss der richtigen Sachlage führte, ist daher hinfällig.

Zum Schlusse möchten wir noch Einiges über die vermeintliche Identität der Katalase mit den reducirenden Fermenten oder Reductasen mittheilen. Pozzi-Escot¹⁾, welcher sich mit diesen Fermenten beschäftigte, behauptet, dass die Fähigkeit, Hydroperoxyd unter Sauerstoffentwicklung zu zersetzen, der »Reductase« und nicht einem besonderen Fermente zukommt. Er wiederholte die Löw'schen Versuche über die Tabakkatalase und fand, dass dieselbe nicht nur Hydroperoxyd zu zersetzen, sondern auch Schwefel zu Schwefelwasserstoff zu reduciren im Stande war. Reductasepräparate sollen die Eigenschaft, Hydroperoxyd zu zersetzen, in noch höherem Grade als die Löw'sche Katalase besitzen.

Da bekanntlich wasserstoffzuführende Agentien den activen Sauerstoff des Hydroperoxyds sofort unter Wasserbildung in Anspruch nehmen, so ist uns a priori unbegreiflich, wie eine Reductase, welche nach Pozzi-Escot stets Wasserstoff in statu nascendi abgiebt, Hydroperoxyd unter Sauerstoffentwicklung zersetzen kann. Directe Versuche ergaben in der That, dass unsere reinere Katalase völlig reductasefrei war.

0.02 g Katalase wurden mit 10 ccm Wasser, 0.5 g Schwefelblumen und 1 ccm Toluol in einem verschlossenen Kolben, in dessen Innerem ein mit Bleiacetatlösung getränktes Filtrirpapier aufgehängt war, sich selbst überlassen. Nach 48 Stunden war das Papier auch nicht spurenweise geschwärzt. Die

¹⁾ Bull. de la soc. chim., Paris [3] 27, 280 [1902].

vom Schwefel abfiltrirte Lösung zersetzte Hydroperoxyd ziemlich stark. Das active Princip war also durch den Toluolzusatz nicht geschädigt.

Eines der kräftigsten Katalasepräparate, welches wir unter den Händen hatten, war durch Extraction von zerriebenen, frischen Meer-schweinchenlebern mit 40-procentigem Alkohol dargestellt. Es zersetzte 5-procentige Hydroperoxydlösung fast explosionsartig. Aber auch dieses Präparat gab nach längerer Einwirkung auf Schwefel unter Toluolzusatz keine Spur von Schwefelwasserstoff.

Es kann also keinem Zweifel unterliegen, dass es Katalasepräparate giebt, welche frei von reducirenden Enzymen sind. Die Katalase ist daher mit der Reductase nicht identisch.

Genf. Pflanzenchemisches Laboratorium des Botanischen Instituts.

314. Fr. Plzák: Ueber Cyclamin.

[Aus dem chem. Institute der k. k. böhm. Universität in Prag.]

(Eingeg. am 16. Mai 1903; mitgetheilt in der Sitzung von Hrn. C. Neuberg.)

Cyclamin, das Glykosid der Cyclamenknollen, wurde schon vor längerer Zeit von de Luca¹⁾, Saladin²⁾, Klinger, Buchner und Herberger³⁾, Martius⁴⁾, Mutschler⁵⁾ und in der letzten Zeit von B. Raýman⁶⁾ studirt. Weil aber dessen chemischer Charakter nur theilweise aufgeklärt wurde, habe ich es einem gründlichen Studium unterworfen. Das dazu nothwendige Material wurde mir durch die besondere Gefälligkeit des Hrn. Prof. Dr. B. Raýman zur Verfügung gestellt.

Behufs Isolirung des Cyclamins nach der Martius'schen Vorschrift wurden die bei gewöhnlicher Temperatur getrockneten Knollen mit 70-proc. Alkohol extrahirt und der alkoholische Extract im Vacuum zur Syrupdicke abgedampft; durch Lösung desselben in absolutem Alkohol wurde das noch nicht näher untersuchte Polysaccharid Cyclamosin (auch Cyclamose genannt) abgeschieden. Nach abermaligem Eindampfen der filtrirten, alkoholischen Lösung blieb eine dicke Masse zurück, aus welcher sich nach einigen Tagen Cyclamin grösstentheils körnig ausschied. Hierauf wurde es abgepresst und durch Auflösen in heissem Alkohol gereinigt; es löst sich in heissem

¹⁾ Compt. rend. 44, 723.

²⁾ Journal de chimie médicale 6, 417.

³⁾ Repert. f. Pharm. 37, 36.

⁴⁾ Neues Repert. f. Pharm. 8, 388.

⁵⁾ Ann. d. Chem. 185, 214.

⁶⁾ Bulletin international de l'Académie des Sciences de Bohême 1896; Chem. Centralblatt 1897, I, 230.