

(Ann. d. Chem. 288, 267 [1895]) haben gezeigt, dass das Pelouze'sche Salz, in Abweichung von dem Verhalten eines jeden Ammoniakderivates, das zweifellos als ein Sulfonderivat anzusprechen ist, kein Stickoxydul oder Nitramid beim Vermischen mit Salpetersäure und Schwefelsäure in der Kälte liefert.

London W. 3 Canning Place.

325. A. Bach: Zur Kenntniss der Katalase.

(Eingegangen am 29. April 1905.)

Das gleichzeitige Vorkommen von Peroxydase und Katalase im thierischen und pflanzlichen Organismus verleiht der Frage nach der gegenseitigen Beeinflussung dieser Fermente bei der Ausübung ihrer specifischen Einwirkung auf Hydroperoxyd ein besonderes Interesse. Die ersten Versuche, welche ich vor zwei Jahren im Verein mit R. Chodat¹⁾ über diesen Gegenstand angestellt hatte, ergaben folgende Resultate:

1. Bei der Zersetzung des Hydroperoxyds unter Entwicklung von inertem Sauerstoff wird die Katalase durch die Anwesenheit von Peroxydase in ihrer Wirkung nicht im mindesten gestört, vorausgesetzt, dass kein durch das System Peroxydase-Hydroperoxyd oxydirbares Substrat zugegen ist.

2. In letzterem Falle übt dagegen die Peroxydase ihre volle Wirkung aus, ohne durch die Gegenwart von Katalase gestört zu werden.

Zur Zeit, als diese Versuche ausgeführt wurden, war noch keine Methode zur genauen Messung der Wirkung der Peroxydase bekannt, sodass wir uns in Bezug auf Letztere auf Färbungsreactionen beschränken mussten, wobei natürlich die quantitativen Verhältnisse zwischen Peroxydase, Katalase und Hydroperoxyd nicht genügend berücksichtigt werden konnten. Die von mir²⁾ später ausgearbeitete Pyrogallolmethode zur Bestimmung des Activierungsvermögens der Peroxydase gestattet nunmehr, die gegenseitige Beeinflussung der Peroxydase und der Katalase bei ihrer Einwirkung auf Hydroperoxyd quantitativ zu verfolgen. Ich stellte daher neuerdings in dieser Richtung weitere Versuche an, über welche in Folgendem kurz berichtet werden soll. Aus theoretischen Gründen war zu erwarten, dass unter geeigneten Versuchsbedingungen eine Vertheilung des Hydroperoxyds zwischen Peroxydase und Katalase in gesetzmäßiger

¹⁾ A. Bach und R. Chodat, diese Berichte 36, 1757 [1903].

²⁾ Diese Berichte 37, 3785 [1904].

gem Verhältniss zu der Concentration der betreffenden Fermente stattfinden würde. Es sei hier voraus bemerkt, dass die neuen Versuche lediglich die Richtigkeit der früheren Beobachtungen bestätigten. Sie ergaben aber zugleich einige bemerkenswerthe Resultate bezüglich der Wirkungsweise und der Eigenschaften der Katalase.

Die zu diesen Versuchen angewandte Peroxydase wurde in der früher¹⁾ beschriebenen Weise aus Meerrettigwurzeln dargestellt; nur wurde bei der Ausfällung des Enzyms aus seiner alkoholisch-wässrigen Lösung der Zusatz von Aether zum absoluten Alkohol weggelassen. Es stellte sich nämlich heraus, dass bei längerer Berührung mit Aether die Peroxydase ihre Wirksamkeit mehr oder weniger einbüsst, wahrscheinlich in Folge der bekannten Fähigkeit des Aethers, leicht sehr active Peroxyde zu bilden²⁾, durch welche das Ferment theilweise zerstört wird.

Die Katalase wurde der leichtereren Zugänglichkeit wegen aus thierischen Geweben dargestellt. Als ein gut geeignetes Material erwiesen sich Fettgewebe, welche, wie es schon von Liebermann³⁾ beobachtet worden ist, ziemlich reich an Katalase sind. Ein wichtiger Vortheil dieses Materials liegt weiter darin, dass es leicht völlig peroxydasefreie Katalasepräparate liefert.

500 g frisches Rindfett (Nieren) wurden von bluthaltigen (und daher auch peroxydasehaltigen) Geweben sorgfältig befreit und mit 100 g Glaspulver und 50 ccm 1-procentiger Natriumbicarbonatlösung in einem grösseren Mörser zerstoßen. Die erhaltene teigige Masse wurde dann mit 250 ccm lauwarmem Wasser längere Zeit durchgeknetet. Das trübe, weisse Extract wurde klar filtrirt und mit absolutem Alkohol gefällt. Der entstandene Niederschlag wurde rasch abfiltrirt, mit absolutem Alkohol nachgewaschen und im Exsiccator über Chlorcalcium vom Alkohol befreit. In dieser Weise wurde eine hornartige, weisse Masse erhalten (2.3 g), von der nur etwa $\frac{1}{10}$ in Wasser löslich war. Die wässrige Lösung gab deutliche Eiweissreactionen und zersetzte Hydroperoxyd ziemlich stark. 1 ccm einer Lösung, welche in 100 ccm 0.025 g lösliche Substanz enthielt, setzte aus 10 ccm 1-procentiger Hydroperoxydlösung binnen 1 Minute den sämmtlichen Peroxydsauerstoff in Freiheit.

Für die beabsichtigten Versuche über die Vertheilung des Hydroperoxyds zwischen Peroxydase und Katalase war eine genaue Kenntniss des Verhaltens des dargestellten Katalase-Präparates gegen das Peroxyd unbedingt erforderlich. In erster Linie kam hier die Abhängigkeit der Wirkung der Katalase von der Ferment- und Substrat-Concentration in Betracht. Die Versuche wurden

¹⁾ Diese Berichte 37, 3787 [1904].

²⁾ Vergl. diese Berichte 38, 774 [1905]. ³⁾ Diese Berichte 38, 1524 [1905].

in ähnlicher Weise, wie bei der Untersuchung der Wirkungsweise der Peroxydase¹⁾ ausgeführt.

Zehn breithalsige Reaktionsfläschchen wurden in ein grösseres Wasserbad bei Zimmertemperatur gestellt und aus Vorrathsflaschen, welche sich ebenfalls im Wasserbade befanden, mit der berechneten Menge Wassers, gleichen Mengen Katalase-Lösung und steigenden Mengen Hydroperoxyds beschickt. Der Moment des Zubringens des Hydroperoxyds wurde als Beginn der Reaction notirt. Durch kurzes Umschwenken wurde die Reactionsflüssigkeit gut durchgemischt und dann im Wasserbade ruhig stehen gelassen. Nach Verlauf von genau 60 Minuten wurde durch Zusatz von verdünnter Schwefelsäure die Reaction unterbrochen und in der Reactionsflüssigkeit das nicht zersetzte Hydroperoxyd mittels annähernd 0.01-normaler Kaliumpermanganatlösung zurücktitrirt. Durch besondere Controllversuche wurde festgestellt, dass die Katalaselösung auch bei den höheren Concentrationen Kaliumpermanganat äusserst schwach und erst nach längerer Einwirkung reducirte.

Zur Verwendung kamen eine Katalaselösung, welche in 1 cem 0.05 mg lösliche Substanz enthielt, und eine 1-procentige Lösung von chemisch reinem Hydroperoxyd. Das Volumen der Flüssigkeit betrug in jedem Falle 50 cem. 5 Versuchsreihen wurden mit wechselnden Katalasemengen (1–5 cem der obigen Lösung) und wechselnden Hydroperoxydmengen (10–100 mg) ausgeführt. Die Versuchsreihen wurden nach der Concentration der Katalase geordnet, sodass in jeder Reihe die Reaktionsfläschchen gleiche Katalase- und steigende Hydroperoxyd-Mengen enthielten. Während der Versuchsdauer zeigte das im Wasserbade tauchende Thermometer die constante Temperatur von 10°.

In folgender Tabelle sind die Ergebnisse dieser Versuche zusammengestellt.

		Zersetztes Hydroperoxyd				
		Katalase-Concentrationen				
		A	B	C	D	E
		1 cem	2 cem	3 cem	4 cem	5 cem
Hydroperoxydconcentrationen	I. 10 mg . . .	7.09 mg	9.41 mg	10.00 mg	10.00 mg	10.00 mg
	II. 20 » . . .	12.79 »	17.67 »	19.18 »	20.00 »	20.00 »
	III. 30 » . . .	16.28 »	25.00 »	29.41 »	30.00 »	30.00 »
	IV. 40 » . . .	18.95 »	31.28 »	37.09 »	39.18 »	40.00 »
	V. 50 » . . .	20.03 »	36.86 »	44.88 »	48.38 »	50.00 »
	VI. 60 » . . .	21.62 »	40.45 »	52.09 »	57.32 »	60.00 »
	VII. 70 » . . .	23.02 »	42.90 »	57.67 »	66.04 »	69.63 »
	VIII. 80 » . . .	22.94 »	44.88 »	62.67 »	72.90 »	78.74 »
	IX. 90 » . . .	22.90 »	46.28 »	67.32 »	79.06 »	86.16 »
	X. 100 » . . .	22.98 »	46.16 »	70.11 »	84.65 »	93.83 »

Aus dieser Tabelle geht mit voller Klarheit hervor, dass die Grösse des in der Zeiteinheit durch die Katalase bewirkten Umsatzes

¹⁾ Diese Berichte 37, 2434 [1904].

sowohl von der Concentration des Hydroperoxyds, wie von der des Fermentes abhängig ist. Sie wächst nämlich mit beiden Concentrationen, wenn auch langsamer als dieselben, bis auf ein bestimmtes Maximum und bleibt dann stehen. Zur vollen Ausnutzung der Katalase ist also eine bestimmte Hydroperoxyd-Concentration, zur vollen Ausnutzung des Hydroperoxyds eine bestimmte Katalase-Concentration erforderlich. Dass nach Erreichung des Katalase-Maximums die Grösse des Umsatzes den Hydroperoxydmengen genau proportional ist, liegt auf der Hand, da hier sämtliches Hydroperoxyd zersetzt wird (DI—DIV, EI—EVII). Das Gegentheil ist aber auch richtig, d. h., nach Erreichung des Hydroperoxyd-Maximums ist die Grösse des Umsatzes der Concentration der Katalase direct proportional (AIX—BIX; AX—BX—CX).

Noch deutlicher tritt letztere Proportionalität in folgender Versuchsreihe zum Vorschein, bei welcher eine oberhalb des erforderlichen Maximums liegende Hydroperoxyd-Concentration (150 mg Wasserstoffsperoxyd in 50 ccm) angewandt wurde:

	A	B	C	D	E
Katalase Concentrationen	1 ccm	2 ccm	3 ccm	4 ccm	5 ccm
Zersetztes Hydroperoxyd	23.02 mg	46.51 mg	70.00 mg	92.20 mg	118.02 mg

Die Wirkung der Katalase folgt also derselben Regel, welche von mir¹⁾ bei der Peroxydase beobachtet worden ist und welche anscheinend auch für andere Fermente gültig ist, nämlich: bei überschüssiger Fermentmenge ist der Umsatz den Substratmengen, bei überschüssiger Substratmenge den Fermentmengen direct proportional. Bei der Peroxydase, welche auf ein zusammengesetztes Substrat (Hydroperoxyd + oxydirbare Substanz) einwirkt, complicirt sich diese Regel in der Weise, dass der Umsatz den Mengen der einzelnen Substratbestandtheile (also z. B. den Hydroperoxydmengen bei überschüssigen Peroxydase- und Jodwasserstoffsäure-Mengen, den Jodwasserstoffsäure-Mengen bei überschüssigen Peroxydase- und Hydroperoxyd-Mengen) proportional ist. Diese Thatsachen lassen sich am einfachsten im Sinne der Annahme deuten, dass Ferment und Substrat an der Reaction in constanten Verhältnissen unter Bildung von intermediären Verbindungen betheiligt sind²⁾.

¹⁾ Diese Berichte 37, 3785 [1904].

²⁾ Die Ansicht, dass Katalase und Hydroperoxyd sich zu einer intermediären, peroxydartigen Verbindung vereinigen, wurde zuerst von Kastle und Löwenhardt (American chemical Journal 29, 585 [1903]) ausgesprochen.

Für die beabsichtigten Vertheilungsversuche war es weiter erforderlich, die Reaktionsgeschwindigkeit des von mir dargestellten Katalase-Präparates zu ermitteln, da es nur bei einer genauen Kenntniss dieser Reaktionsgeschwindigkeit möglich war, vergleichbare Peroxydase- und Katalase-Mengen anzuwenden. Die übliche, auch von G. Senter¹⁾ in seiner gründlichen Arbeit über die Reaktionsgeschwindigkeit der Katalase benutzte Methode erwies sich unter den von mir eingehaltenen Versuchsbedingungen als unbrauchbar. Es stellte sich nämlich heraus, dass bei dem Abpipettiren der Flüssigkeit aus der Reactionsflasche eine so lebhaft Sauerstoffentwicklung im Inneren der Pipette stattfand, dass ein genaues Abmessen des Reaktionsgemisches so gut wie unmöglich war. Ich griff daher zu der Methode zurück, welche bereits bei der Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeit der Peroxydase gute Dienste leistete²⁾.

Die Versuche wurden in der oben angegebenen Weise mit 10 Reactionsfläschchen bei 12° ausgeführt. Angestellt wurden 3 Versuchsreihen mit constanter Hydroperoxydconcentration (100 mg Wasserstoffsperoxyd in 50 ccm) und wechselnder Katalase-Concentration (3, 6 und 12 ccm der oben erwähnten Lösung). Der Hauptzweck dieser Versuche war die Ermittlung der Katalase-Concentration, welche zur Zersetzung von 100 mg Wasserstoffsperoxyd in 50 ccm binnen 10 Minuten (Concentrations- und Zeit-Verhältnisse der Pyrogallolmethode zur Bestimmung des Activirungsvermögens der Peroxydase) erforderlich war. Die erhaltenen Resultate sind in folgender Tabelle angegeben:

A. 100 mg Hydroperoxyd, 3 ccm Katalaselösung in 50 ccm.						
Minuten	2	4	6	8	10	
Zersetztes Hydroperoxyd mg:	20.92	29.99	34.52	38.04	42.61	
Minuten		15	20	25	40	50
Zersetztes Hydroperoxyd mg:		48.33	54.73	62.38	64.28	65.23.
B. 100 mg Hydroperoxyd, 6 ccm Katalaselösung in 50 ccm.						
Minuten	2	4	6	8	10	
Zersetztes Hydroperoxyd mg:	31.90	43.33	51.66	58.40	63.59	
Minuten		15	20	25	40	50
Zersetztes Hydroperoxyd mg:		77.14	84.76	92.38	96.19	97.11.
C. 100 mg Hydroperoxyd, 12 ccm Katalaselösung in 50 ccm.						
Minuten	2	4	6	8	10	
Zersetztes Hydroperoxyd mg:	61.19	77.57	89.99	95.00	98.09	
Minuten		15	20	25	40	50
Zersetztes Hydroperoxyd mg:		99.04	99.06	99.02	—	—

¹⁾ Zeitschr. für physikal. Chem. 44, 257 [1903]

²⁾ Diese Berichte 37, 2434 [1904].

Vergleicht man die Zeiten, welche in den 3 Versuchsreihen zur Zersetzung von etwa $\frac{2}{3}$ der angewandten Hydroperoxydmenge erforderlich waren (62.38 mg), so findet man folgende Werthe:

$$A:B:C = 30:9.5:2.4.$$

1 : 2 : 4.

Unter den von mir eingehaltenen Versuchsbedingungen wächst also die Reaktionsgeschwindigkeit der Katalase viel schneller, als die Concentration der Letzteren. Bei Verdoppelung der Concentration steigt die Geschwindigkeit auf das Dreifache, bei Vervielfachung auf das Zwölffache der ursprünglichen Geschwindigkeit. Diese Ergebnisse bestätigen gewissermaassen die Beobachtungen, welche Senter¹⁾ mit der Katalase aus Blut gemacht hatte. Dieser Forscher fand nämlich, dass die Reaktionsgeschwindigkeit der Katalase nur in sehr verdünnten Hydroperoxydlösungen (etwa $\frac{1}{300}$ -molar) dem Gesetz der Massenwirkung in erster Annäherung gehorcht. Bei höheren Hydroperoxyd-Concentrationen wächst dagegen die Geschwindigkeit schneller als die Enzymmengen. Die Abweichungen von den einfachen Gesetzen sucht Senter durch den Einfluss des Hydroperoxyds auf die Katalase zu erklären. Bei der ausserordentlich hohen Empfindlichkeit der Katalase-Reaction gegen chemische und physikalische Einflüsse ist man vielmehr zu der Annahme berechtigt, dass diese Abweichungen dem Einflusse der unbekanntes und unbestimmbaren Beimengungen zuzuschreiben sind, welche bei der Isolirung der Katalase mit in den Kauf genommen werden müssen.

Nachdem also das Verhalten des von mir dargestellten Katalasepräparates gegen Hydroperoxyd durch obige Versuche ermittelt worden war, wurden die quantitativen Versuche über die Vertheilung des Hydroperoxyds zwischen Peroxydase und Katalase angestellt. Von den Oxydationsreactionen, welche durch das System Peroxydase-Hydroperoxyd ausgelöst werden, lassen sich nur zwei — die Oxydation des Pyrogallols und die der Jodwasserstoffsäure — quantitativ verfolgen. Da aber bekanntlich die Katalase durch freies Jod sehr rasch zerstört wird, so konnte für die beabsichtigten Vertheilungsversuche nur die Oxydation des Pyrogallols benutzt werden. Die Versuche wurden in folgender Weise ausgeführt:

In 6 Erlenmeyer-Kolben wurden der Reihe nach Pyrogallollösung (10 ccm einer 15-procentigen Lösung), Peroxydaselösung (je 1 Aequivalent), Katalaselösung (0–5 Aequivalente), Wasser bis auf 40 ccm und dann Hydroperoxydlösung (10 ccm einer 1-procentigen Lösung) gegeben. Nach 24 Stunden wurden die entstandenen Purpurogallin-Niederschläge auf tarirte Filter gebracht,

¹⁾ Zeitschr. für physikal. Chem. 44, 286 [1903].

mit je 200 ccm Wasser sorgfältig ausgewaschen, bei 110° bis Gewichtsconstanz getrocknet und gewogen.

Schon bei der Ausführung der Reaction fiel es auf, dass trotz der Anwesenheit von verhältnissmässig grossen Katalasemengen keine Sauerstoffentwicklung in den Reaktionsgemischen bemerkbar war und dass in allen Kolben anscheinend gleiche Purpurogallin-Niederschläge entstanden waren. Die Wägung der getrockneten Niederschläge ergab in der That folgende Zahlen:

Katalasezusatz: 0 Aequiv. 1 Aequiv. 2 Aequiv. 3 Aequiv. 4 Aequiv. 5 Aequiv.
Purpurogallin: 0.201 g 0.203 g 0.200 g 0.205 g 0.201 g 0.203 g.

Die Anwesenheit von 1—5 Aequivalenten Katalase übte also auf die Oxydation des Pyrogallols durch das System Peroxydase-Hydroperoxyd keinerlei Einfluss aus. Das völlige Ausbleiben der erwarteten Vertheilung des Hydroperoxyds zwischen Peroxydase und Katalase liess der Vermuthung Raum, dass letzteres Ferment durch Pyrogallol ausser Thätigkeit gesetzt wird.

Wie aus folgenden Versuchen hervorgeht, ist dies thatsächlich der Fall:

- a) 1 Aequivalent Katalase, 0.1 g Wasserstoffsperoxyd in 50 ccm.
- b) 1 Aequivalent Katalase, 1.5 g Pyrogallol, 0.1 g Wasserstoffsperoxyd in 50 ccm.

Entwickelter Sauerstoff.

Nach 10 Minuten: a) 31.8 ccm (0°, 760 mm), b) 0.0 ccm
» 180 » a) 31.8 » (0°, 760 » b) 0.6 »

Nach 24-stündigem Stehenlassen wurde das Reaktionsgemisch b) mit 1 Aequivalent Peroxydase versetzt und das entstandene Purpurogallin in üblicher Weise gewogen. Erhalten: 0.191 g anstatt 0.202 g (Mittel aus obigen 6 Versuchen).

Die zur Zeit vorhandenen quantitativen Methoden gestatten also nicht, die Vertheilung des Hydroperoxyds zwischen Peroxydase und Katalase zu verfolgen. Ich hoffe aber, auf einem anderen Wege der Entscheidung der Frage näher zu treten. Immerhin ist die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, dass eine derartige Vertheilung überhaupt nicht zu Stande kommt. Wie schon früher¹⁾ bewiesen wurde, ist die Katalase ohne jede Einwirkung auf substituirte Hydroperoxyde (Aethylhydroperoxyd). Andererseits kann auf Grund der bisher gemachten Erfahrungen mit ziemlicher Sicherheit angenommen werden, dass Peroxydase und Hydroperoxyd sich zu einem substituirten Hydroperoxyd vereinigen. Ist nun die Geschwindigkeit, mit welcher diese intermediäre Verbindung entsteht und ihren activen Sauerstoff an das oxydirbare Substrat abgiebt, grösser als die Geschwindigkeit, mit welcher

¹⁾ Diese Berichte 36, 1757 [1903].

sie zurück in Peroxydase und Hydroperoxyd zerfällt, so mag dadurch in einem Gemische von oxydirbarem Substrat, Peroxydase, Katalase und Hydroperoxyd Letzteres je nach den vorhandenen Peroxydase-mengen der Einwirkung der Katalase theilweise oder völlig entzogen werden.

Genf, Privatlaboratorium.

**326. E. H. Riesenfeld, H. E. Wohlers und W. A. Kutsch:
Höhere Oxydationsproducte des Chroms.**

[Aus dem chem. Univers.-Laboratorium, Philosoph. Abtheilung, Freiburg i. B.]
(Eingeg. am 17. April 1905; mitgetheilt in der Sitzung von Hrn. A. Stähler.)

Seit Barreswil¹⁾ 1847 die bei der Einwirkung von Wasserstoff-superoxyd auf Chromat- und Bichromat-Ionen entstehende Blaufärbung beobachtete, die auf die Existenz höherer Oxydationsproducte des Chroms hinweist, sind von Schönbein, Moissan, Berthelot u. A. zahlreiche, doch meist vergebliche Versuche gemacht worden, diese Körper zu isoliren oder ihre Zusammensetzung zu erforschen.

Erst Wiede²⁾ gelang es im Jahre 1897, die gesuchten Substanzen in reinem Zustande darzustellen. Er konnte zwei Oxydationsstufen des Chroms durch krystallisirte Derivate charakterisiren: nach der von ihm vorgeschlagenen Nomenclatur 1) Chromtetroxyd (CrO_4) und 2) Ueberchromsäure (HCrO_5). Vom Chromtetroxyd isolirte er ein Ammoniakderivat von der Zusammensetzung $\text{CrO}_4 \cdot 3\text{NH}_3$ und ein Cyankalium-Doppelsalz von der Formel $\text{CrO}_4 \cdot 3\text{KCN}$. Durch die Darstellung einer Anzahl organischer Salze, sowie eines Ammoniumsalzes der Formel $(\text{NH}_4)\text{CrO}_5 + \text{H}_2\text{O}_2$ und eines Kaliumsalzes der Formel $\text{KCrO}_5 + \text{H}_2\text{O}_2$ glaubte er für die Ueberchromsäure die Formel HCrO_5 hinlänglich sichergestellt zu haben.

Die Gewinnung dieser Chromsalze nach Wiede ist nicht nur recht schwierig und umständlich, die so erhaltenen Salze sind auch sehr explosiv und das Arbeiten mit ihnen daher recht gefahrvoll, wie Wiede aus eigener schlimmer Erfahrung zu berichten weiss.

Um so mehr waren wir erstaunt, dass man auf einem relativ einfachen Wege, nämlich durch directe Oxydation von Chromatösungen mit 30-proc. Wasserstoffsuperoxyd schön krystallisirte Salze herstellen kann, die zum Theil Monate lang unzersetzt haltbar

¹⁾ Ann. chim. phys. (3) 20, 364.

²⁾ Diese Berichte 30, 2178 [1897]; 31, 516 [1898].