

$C_{51}H_{39}O_9N_3$. Ber. C 73.1, H 4.7, N 5.0.
Gef. » 73.1, 73.2, » 5.2, 5.3, » 5.7, 4.8.

Zu einer Molekulargewichtsbestimmung konnten leider bisher nach nicht genügende Substanzmengen erhalten werden.

Bei den Versuchen, die Benzoylierung des Hydroxamoximhydrats nach der Schotten-Baumannschen Methode auszuführen, wurden außer Dibenzhydroxamsäure nur schmierige Produkte erhalten.

32. A. Bach: Über das Verhalten der Peroxydase gegen Jod. (Eingegangen am 29. Dezember 1906.)

Die aus Meerrettichwurzeln und anderen Pflanzenmaterialien erhältliche Peroxydase aktiviert Hydroperoxyd lediglich bei der Oxydation der Jodwasserstoffsäure, der aromatischen Amine und der Phenole. Diesen drei Körperklassen ist nur die Anwesenheit von beweglichem Wasserstoff im Molekül gemein, im übrigen sind sie aber weit von einander verschieden. Gemäß der Lehre von den spezifischen Fermentwirkungen dürften daher an den hier in Betracht kommenden Oxydationsvorgängen mindestens drei verschiedene Peroxydasen beteiligt sein. Bei der Untersuchung von zahlreichen peroxydasehaltigen Materialien habe ich aber bisher in keinem Falle das Ausbleiben irgend einer der erwähnten Aktivierungserscheinungen beobachtet. Pflanzenobjekte, welche Hydroperoxyd bei der Oxydation der Jodwasserstoffsäure aktivieren, tun es stets auch bei der der aromatischen Amine und Phenole.

Diese Beobachtung konnte dadurch erklärt werden, daß die hypothetischen Enzyme in Pflanzen neben einander vorkommen und bei der Verarbeitung der betreffenden Materialien auf Peroxydase zusammen durch Alkohol gefällt werden. Mit Rücksicht auf diese Voraussetzung versuchte ich vor einiger Zeit, eine Trennung der spezifischen Peroxydasen durch fraktioniertes Fällern mit Alkohol bezw. Aceton zu erzielen. Die Versuche ergaben aber ein völlig negatives Resultat. Die einzelnen Fraktionen verhielten sich bei der Aktivierung des Hydroperoxyds, wie die ursprüngliche Peroxydase. Das negative Resultat dieser Versuche konnte indessen noch nicht als Beweis der Einheitlichkeit der Peroxydase gelten, da doch die Möglichkeit nicht ausgeschlossen ist, daß die hypothetischen Peroxydasen sich gegen Alkohol und Aceton in gleicher Weise verhalten.

Zur etwaigen Trennung der vermutlichen Bestandteile der Peroxydase konnte man noch auf einem anderen Weg, nämlich durch die Einwirkung von chemischen Agenzien, kommen. Es war denkbar,

daß die spezifischen Peroxydase eine ungleiche Empfindlichkeit gegen chemische Eingriffe zeigen würden. In erster Linie wurde im Anschluß an frühere Versuche die Einwirkung des Jodes auf Peroxydase untersucht. Auch hier wurde das erwünschte Ziel nicht erreicht. Gelegentlich dieser Untersuchung wurden aber in Bezug auf das Verhalten der Peroxydase gegen Jod einige interessante Beobachtungen gemacht, welche im Folgenden mitgeteilt werden sollen.

Daß Peroxydase — genauer, die Fähigkeit derselben, Hydroperoxyd bei der Oxydation der Jodwasserstoffsäure zu aktivieren — gegen freies Jod verhältnismäßig wenig empfindlich ist, wurde in einer früheren Abhandlung¹⁾ bewiesen. Es war aber von Interesse, den Einfluß des Jodes auf die Aktivierung des Hydroperoxyds durch Peroxydase auch bei der Oxydation der Phenole kennen zu lernen, zumal auch diese Aktivierungserscheinung durch die Purpurogallinbildung aus Pyrogallol quantitativ verfolgt werden kann. Das Aufheben der Aktivierung unter dem Einflusse des Jodes wäre in diesem Falle ein sicherer Beweis dafür, daß die Peroxydase mit ihren bekannten Eigenschaften ein Gemenge von verschiedenen spezifisch wirkenden Enzymen ist.

Die Versuche wurden zunächst mit einem in der früher²⁾ beschriebenen Weise dargestellten alkoholisch-wäßrigen Extrakt aus Meerrettichwurzeln angestellt. Der Gehalt des Extraktes an durch Alkohol fällbarer Peroxydase wurde in folgender Weise bestimmt: 100 ccm desselben wurden in 1 L absoluten Alkohol gegossen, der entstandene Niederschlag wurde quantitativ auf einem tarierten Filter gesammelt, mit absolutem Alkohol gewaschen und bei 30° im Vakuum über Chlorcalcium getrocknet. Erhalten: 0.520 g Peroxydase. Letztere wurde quantitativ in 100 ccm Wasser gelöst, von der Lösung wurden 20 ccm (dem gleichen Volumen des ursprünglichen Extraktes entsprechend) mit 1 g Pyrogallol in 50 ccm Wasser und 30 ccm 1-prozentiger Hydroperoxydlösung zusammengebracht; das entstandene Purpurogallin wurde nach 24 Stunden auf ein tariertes Filter gebracht, mit 200 ccm Wasser ausgewaschen und bei 105° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Erhalten: 0.230 g Purpurogallin. 20 ccm des ursprünglichen Extraktes, mit Pyrogallol und Hydroperoxyd in gleicher Weise behandelt, ergaben 0.227 g Purpurogallin. Aus dieser Bestimmung geht hervor, daß bei Anwendung von hinreichenden Mengen Alkohol die Peroxydase quantitativ, d. i., ohne Verlust an Aktivierungsvermögen, ausgefällt werden kann.

Die Ermittlung des Aktivierungsvermögens der Peroxydase nach dem früher³⁾ beschriebenen Verfahren ergab, daß 20 ccm des Extraktes (= 0.104 g feste Peroxydase) 0.11 g Hydroperoxyd aktivierten.

¹⁾ Über die Wirkungsweise der Peroxydase bei der Reaktion zwischen Hydroperoxyd und Jodwasserstoffsäure. Diese Berichte, 37, 3795 [1904].

²⁾ Diese Berichte 37, 3787 [1907]. ³⁾ Diese Berichte 37, 3787 [1904].

Die Versuche über den Einfluß des Jodes auf das Aktivierungsvermögen der Peroxydase wurden folgendermaßen ausgeführt: 160 ccm des Extraktes wurden mit 40 ccm Jodlösung vermischt, von dem Gemisch wurden zu verschiedenen Zeiten je 25 ccm mit Pyrogallol (1 g in 45 ccm Wasser) und Hydroperoxyd (30 ccm 1-proz. Lösung) zusammengebracht und das entstandene Purpurogallin gewogen. Zur Darstellung der Jodlösung wurde chemisch reines Jod abgewogen und in frisch überdestilliertem Alkohol gelöst. 3 Versuchsreihen wurden mit steigenden Jodmengen und gleichen Peroxydasmengen ausgeführt, wobei für jede Reihe ein Parallelversuch mit der entsprechenden Menge Jod in Abwesenheit von Peroxydase und mit 20 ccm Extrakt ohne Jodzusatz ausgeführt wurde. Durch Vorversuche wurde festgestellt, daß Hydroperoxyd durch freies Jod in ähnlicher Weise wie durch Peroxydase bei der Oxydation des Pyrogallols aktiviert wird, indem aus Letzterem ein jodhaltiges Purpurogallin entsteht.¹⁾

Die Ergebnisse der 3 Versuchsreihen sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

I. 160 ccm Extrakt, 0.050 g Jod in 40 ccm Alkohol. 25 ccm des Gemisches für jeden Versuch.

Dauer der Einwirkung des Jodes:

Am Beginn 2 Stdn. 4 Stdn. 30 Stdn. 76 Stdn. 120 Stdn. 200 Stdn.
 Purpurogallin: 0.229 g 0.228 g 0.227 g 0.252 g 0.263 g 0.287 g 0.298 g
 Kontrollversuche: 0.0075 g Jod in Abwesenheit von Peroxydase . 0.089 g
 20 ccm Extrakt ohne Jodzusatz 0.228 g

II. 160 ccm Extrakt, 0.300 g Jod in 40 ccm Alkohol.

Dauer der Einwirkung des Jodes:

Am Beginn 3 Stdn. 24 Stdn. 48 Stdn. 130 Stdn. 300 Stdn.
 Purpurogallin: 0.391 g 0.392 g 0.398 g 0.400 g 0.408 g 0.424 g
 Kontrollversuche: 0.0375 g Jod in Abwesenheit von Peroxydase . 0.110 g
 20 ccm Extrakt ohne Jodzusatz 0.226 g

III. 160 ccm Extrakt, 0.600 g Jod in 40 ccm Alkohol.

Dauer der Einwirkung des Jodes:

Am Beginn 2 Stdn. 18 Stdn. 40 Stdn. 120 Stdn. 200 Stdn.
 Purpurogallin: 0.429 g 0.426 g 0.424 g 0.420 g 0.405 g 0.389 g
 Kontrollversuche: 0.075 g Jod in Abwesenheit von Peroxydase . 0.135 g
 20 ccm Extrakt ohne Jodzusatz 0.228 g

Größere Jodmengen konnten nicht angewandt werden, da hierbei die Wirkung der Peroxydase durch die des Jodes verdeckt wurde. Aus obigen Zahlen ergibt sich:

¹⁾ Das Purpurogallin wurde hier durch die Blaufärbung mit Alkalien, durch seine Löslichkeit in konzentrierter Schwefelsäure mit orangeroter Farbe und durch die Bildung von Naphtalin beim Destillieren mit Zinkstaub charakterisiert. Der Destillationsrückstand enthielt Jod als Zinkjodid. Letzteres wurde mit heißem Wasser ausgezogen; die filtrierte Flüssigkeit wurde nach Erkalten mit Essigsäure ausgesäuert und mit Hydroperoxyd in Gegenwart von Stärkekleister versetzt. Das Gemisch färbte sich sofort blau.

1. daß bei Anwendung von 0.0075 g Jod auf 20 ccm Extrakt das Aktivierungsvermögen der Peroxydase während der ersten Stunden der Einwirkung unverändert bleibt und dann langsam zu steigen beginnt. Die Mehrausbeute an Purpurogallin betrug nach 200 Stunden langer Einwirkung des Jodes 0.069 g = 30.1 pCt. der am Beginn des Versuches erhaltenen Purpurogallinmenge;

2. daß bei Anwendung von 0.0375 g Jod auf 20 ccm Extrakt sofort eine erhebliche Vergrößerung der Purpurogallinbildung stattfindet. Dabei ist die erhaltene Purpurogallinmenge größer als die Summe der bei den Kontrollversuchen mit Jod allein und mit Peroxydase allein gefundenen Zahlen. Die Differenz beträgt 0.053 g = 15.6 pCt. Bei fortdauernder Einwirkung des Jodes steigt die Purpurogallinmenge langsam weiter und erreicht nach 300 Stunden 0.424 g. Differenz am Abschluß des Versuches 0.090 g = 26.5 pCt.;

3. daß bei Anwendung von 0.075 g Jod auf 20 ccm Extrakt sofort das Maximum der Purpurogallinmenge erhalten wird, welche bei dem voranstehenden Versuche erst nach 30 Stunden langer Einwirkung des Jodes erreicht wurde. Differenz im Vergleich zu den Kontrollversuchen: 0.066 g = 18.7 pCt. Bei weiterer Einwirkung des Jodes findet eine langsame Abnahme des Aktivierungsvermögens der Peroxydase statt.

Diese Beobachtungen lassen sich, meiner Ansicht nach, am einfachsten durch die Annahme erklären, daß das angewandte Peroxydaseextrakt neben fertiger Peroxydase auch das Zymogen derselben enthielt. Unter dem Einflusse des Jodes ging dasselbe umso schneller in aktive Peroxydase über, je größer die vorhandene Jodmenge war. Daß es für Oxydase und Peroxydase bestimmte Zymogene gibt, wurde von A. T. Woods¹⁾ auf Grund einiger Beobachtungen über das Verhalten des Saftes der Tabakpflanze gegen Wären geschlossen.

Mit Rücksicht auf die mit dem Peroxydaseextrakt erhaltenen Resultate war es von Interesse, das Verhalten der gefällten Peroxydase gegen Jod zu ermitteln.

1 g gefällte Peroxydase, welche aus jungen Meerrettichwurzeln dargestellt war, wurde in 200 ccm Wasser gelöst und die Lösung filtriert. Die Ermittlung des mitteierungsvermögens (Hydroperoxyd : Peroxydase) nach der Pyrogallolmethode ergab den ungemein hohen Wert 1.8. Von der filtrierten Lösung wurden 140 ccm (= 0.7 g Peroxydase) mit 0.053 g Jod in 35 ccm Alkohol (also mit je 0.0075 g Jod auf 0.1 g Peroxydase) versetzt; von dem Gemisch wurden dann je 25 ccm zu verschiedenen Zeiten in der oben angegebenen

¹⁾ Observations on the mosaic disease of tobacco. U. S. Departement of Agriculture. Bulletin No. 18, S. 17.

Weise zur Aktivierung des Hydroperoxyds bei der Oxydation des Pyrogallols benutzt. Dabei wurden folgende Zahlen erhalten:

Dauer der Einwirkung des Jodes:

	Am Beginn	48 Stdn.	96 Stdn.	168 Stdn.	240 Stdn.	350 Stdn.
Purpurogallin:	0.376 g	0.373 g	0.377 g	0.370 g	0.372 g	0.376 g
Kontrollversuche:	0.0075 g Jod in Abwesenheit von Peroxydase	. 0.040 g				
	0.1 g Peroxydase ohne Jodzusatz 0.379 g				

Im Gegensatz zu den mit Peroxydaseextrakt erhaltenen Resultaten wird bei Anwendung von 0.0075 g Jod auf 0.1 g gefällte Peroxydase keine Vergrößerung des Aktivierungsvermögens der Peroxydase beobachtet. Ein zweiter Versuch wurde unter annähernd gleichen Konzentrations- und Aktivierungs-Verhältnissen, wie bei Versuch II (s. oben) angestellt.

0.66 g Peroxydase wurden in 200 ccm Wasser gelöst, von der Lösung wurden 140 ccm mit 0.263 g Jod in 35 ccm Alkohol versetzt und das Gemisch in oben angegebener Weise untersucht.

Dauer der Einwirkung des Jodes:

	Am Beginn	48 Stdn.	96 Stdn.	140 Stdn.	216 Stdn.
Purpurogallin:	0.331 g	0.337 g	0.313 g	0.293 g	0.285 g
Kontrollversuche:	0.0375 g Jod in Abwesenheit von Peroxydase	. 0.112 g			
	0.066 g Peroxydase ohne Jodzusatz 0.225 g			

Der Jodzusatz bewirkte hier keine Vergrößerung des Aktivierungsvermögens der Peroxydase, da sofort nach dem Vermischen der Reagenzien fast genau soviel Purpurogallin wie bei den Kontrollversuchen unter getrennter Anwendung von Jod und Peroxydase erhalten wurde. Bei weiterer Einwirkung des Jodes nahm das Aktivierungsvermögen der Peroxydase langsam ab.

Aus obigen Versuchen ziehe ich den Schluß, daß die von mir angewandte feste Peroxydase im Gegensatz zu dem oben erwähnten Peroxydaseextrakt kein Zymogen enthielt.

Was nun das Verhalten der Peroxydase gegen Jod anbelangt, so fällt hier die geringe Empfindlichkeit derselben gegen dieses, sonst verhältnismäßig heftig wirkende Agens auf. Rasch wird Peroxydase erst bei gleichzeitiger Einwirkung von Hydroperoxyd und Jod, und zwar in äquivalenten Mengen (auf das aktivierte Hydroperoxyd bezogen) der drei Reagenzien, zerstört¹⁾. Zu völliger Zerstörung der Peroxydase wäre in vorliegendem Falle die Anwendung von 1.8 g Hydroperoxyd und ca. 13 g Jod auf 1 g Peroxydase erforderlich.

In physiologischer Hinsicht ist das Verhalten des (zymogenhaltigen) Peroxydaseextraktes gegen Jod insofern von Interesse, als in der Schilddrüse der Säugetiere eine Jodverbindung vorkommt, welche bei

¹⁾ Diese Berichte, 37, 3706 [1904].

den im Organismus verlaufenden Oxydationsprozessen eine wichtige Rolle spielt, indem sie auf den Stoffwechsel einen entschieden fördernden Einfluß ausübt. Ob das aktive Prinzip der Schilddrüse auf zymogenhaltige Peroxydaseextrakte in ähnlicher Weise, wie freies Jod wirkt, soll durch weitere Versuche festgestellt werden.

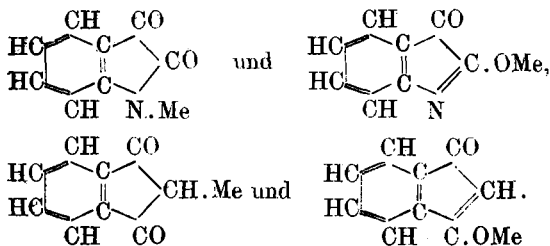
Ich beabsichtige, auch andere chemische Agenzien auf ihre Fähigkeit, das Zymogen der Peroxydase in das aktive Ferment überzuführen, zu prüfen.

Genf, Privatlaboratorium.

88. Walter Peters: Über die Quecksilbersalze des Isatins und 1,3-Diketohydrindens.

(Eingegangen am 29. Dezember 1906.)

Die vorliegende Untersuchung wurde in der Erwartung begonnen, vom Isatin und 1,3-Diketohydrinden je zwei strukturisomere Salze darzustellen, die sich durch die verschiedene Bindung des Metalles unterscheiden würden:



Hierbei war die Arbeit des Hrn. Prof. Hantzsch¹⁾ für mich vorbildlich, dessen gütigem Hinweise ich obiges Thema verdanke, und dem es gelungen war, zwei strukturisomere Quecksilbersalze der Cyanursäure zu erhalten. Das Isatinquecksilber konnte ich jedoch nur in der Stickstoffform erhalten, trotzdem ich die Reaktionsbedingungen nach Möglichkeit variierte. Immerhin ist dies Ergebnis insofern bemerkenswert, als das Isatinsilber²⁾, das ich zum Vergleiche nach der Vorschrift Laurents darstellte, sich dadurch als Sauerstoffsalz zu erkennen gibt, daß es beim Digerieren mit Natronlauge Silberoxyd abscheidet.

¹⁾ Diese Berichte **35**, 2717 [1902].

²⁾ Journ. f. prakt. Chem. [2] **35**, 108; diese Berichte **15**, 2093 [1882].