

krystallisiert. In beiden Fällen wurde die gleiche Krystallisation beobachtet, unter dem Mikroskop waren die Krystalle der beiden Proben — längliche Prismen mit schräger Abschneidung — nicht von einander zu unterscheiden.

Im übrigen stimmten die Löslichkeitsverhältnisse und Eigenschaften unseres Inosits in allen Punkten vollkommen mit denen der Kontrollsubstanz. Wir haben schließlich noch, um bei der Feststellung der Identität gar nichts zu versäumen, unser Präparat mit Essigsäureanhydrid und wenig Chlorzink acetyliert¹⁾. Der erhaltene Hexaacetyl-inosit wurde aus wenig Alkohol umkrystallisiert. Wie bei einem Vergleichspräparat gewann man glänzende Schuppen vom scharfen Schmp. 210—211°. Das Kontrollpräparat schmolz am gleichen Thermometer bei 211°, eine Mischprobe bei 210—211°.

Wir haben bei dem hier beschriebenen Versuch die Einzelausbeuten, die sich natürlich nicht auf die angegebenen 0.3 g beschränken, nicht festgestellt, haben aber, ohne die Mutterlauge völlig durchzuarbeiten, schon mehr als 1 g Inosit erhalten, so daß wir die Synthese des Inosits im Anschluß an die schöne Arbeit von Nietzki und Benckiser als Präparat für den Laboratoriumsunterricht empfehlen können.

292. Heinrich Wieland: Über den Mechanismus der Oxydationsvorgänge (III).

[Aus dem Chemischen Laborat. der Kgl. Akad. der Wissensch. zu München.]
(Eingegangen am 13. Juni 1914.)

In der letzten Abhandlung²⁾ habe ich den Nachweis geführt, daß typische biologische Oxydationen ohne Beteiligung von Sauerstoff vor sich gehen können. Die am längsten bekannte Oxydation, die durch die Alkohol-Oxydase der Essigsäurebakterien erfolgende Überführung von Alkohol in Essigsäure, wurde mit aller Schärfe als Dehydrierungsreaktion erwiesen. Während man bisher fast allgemein die freilich unbewiesene Anschauung hatte, daß die im organischen Leben vor sich gehenden Oxydationen unter katalytischer Mithilfe von sauerstoff-aktivierenden Fermenten (im Sinne der Engler-Bachschenschen Peroxyd-Theorie) verlaufen, konnte ich für eine Reihe von Fällen einwandfrei sicherstellen, daß die Fermentwirkung vielmehr in einer Aktivierung des Wasserstoffs besteht, der dann gleich nascentem Wasserstoff an geeignete Wasserstoffacceptoren abgegeben wird. Der

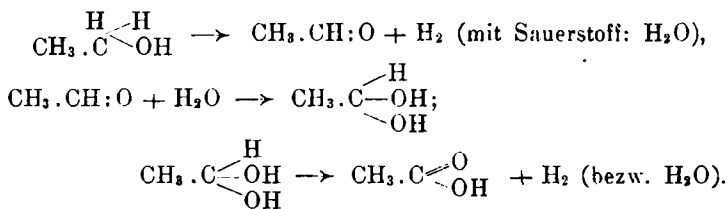
¹⁾ Nach Maquenne, a. a. O.

²⁾ B. 46, 3327 [1913].

biologisch wichtigste Wasserstoffacceptor ist naturgemäß der Sauerstoff. Ihm fällt nach meiner Auffassung die Rolle zu, den durch die dehydrierenden Fermente aktiv gemachten Wasserstoff der zu verbrennenden Stoffe in der exothermen Reaktion der Wasserbildung wegzuschaffen.

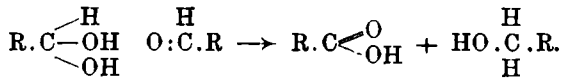
Von besonderer Bedeutung für die experimentelle Durchführung dieser Theorie war das Studium der Aldehyd-Oxydation, bei der scheinbar aktiver Sauerstoff in das Molekül hineingeht.

Es ließ sich nachweisen, daß die Umwandlung der Aldehyde in Carbonsäuren fast allgemein ihren Weg über die Aldehyd-hydrate nimmt; sie sind es, die durch Wegnahme von Wasserstoff zu den Säuren dehydriert werden. Für das Verständnis vieler Vorgänge — ich erinnere nur an die alkoholische Gärung, an die Atmung der Pflanzen und an den Abbau der Aminosäuren im Organismus — ist diese Erkenntnis schon jetzt wertvoll geworden. Wir kommen also mit ihr, um auf das oben angezogene Beispiel der Essigsäure-Gärung zurückzugreifen, zu folgendem Ausdruck für den Mechanismus dieser Bio-Oxydation.



Von der experimentellen Bearbeitung der Oxydationsreaktionen vom Standpunkt der Dehydrierungstheorie aus haben sich dann noch Einblicke ergeben in Gebiete, die scheinbar abseits lagen. Es war von vornherein zu vermuten, daß die reduzierenden Fermente, die fast allerorts als eine besondere Gruppe biologischer Katalysatoren bezeichnet werden, mit den Dehydrasen identisch seien. Denn faßt man das Substrat, die zu dehydrierende Substanz, ins Auge, so wirkt die Dehydrase als Oxydase, betrachtet man aber die Veränderung des Wasserstoffacceptors, so hat man den Effekt einer Reduktion. Dies wird ohne weiteres klar, wenn wir an Stelle von Sauerstoff, der das Reduktionsprodukt Wasser ergibt, z. B. Chinon als Wasserstoffacceptor in den Gang einer Dehydrierungsreaktion einfügen. Dann wird die Alkohol-Oxydase der Essigsäurebakterien alsbald auch gleichzeitig zur Reduktase; denn sie vermag Chinon in Hydrochinon, Methylenblau in die Leukoverbindung umzuwandeln. Einen besonderen Fall einer derartigen Reduktionswirkung bildet, wie ich schon in der letzten Abhandlung vermutet habe, die nach Art der Cannizzaro-

schen Reaktion enzymatisch beschleunigte Disproportionierung von Aldehyd zu Carbonsäure und Alkohol:



Die vorliegende Abhandlung befaßt sich eingehender mit den enzymatisch beschleunigten Umsetzungen der Aldehyde, im besonderen des Salicylaldehyds. Vor Besprechung der Resultate sei ein kurzer Überblick über die wichtigsten bisher vorliegenden Untersuchungen gegeben.

Schmiedeberg¹⁾ hat zuerst gefunden, daß die überlebende Niere imstande ist, Salicylaldehyd zu Salicylsäure zu oxydieren, sein Schüler Jacquet²⁾ hat später diese Beobachtung erweitert und gezeigt, daß auch wäßrige Auszüge von Organen, wie Leber, Niere, Lunge dazu befähigt sind. Als Trägerin dieser beschleunigenden Wirkung sah man eine spezifische Oxydase³⁾, die Aldehydase oder auch Salicylase, wie das Ferment genannt wurde, an. Parnas⁴⁾ und gleichzeitig mit ihm Battelli und Stern⁵⁾ haben später in ausgezeichneten Arbeiten festgestellt, daß die erwähnten Organe ein Ferment enthalten, das den Effekt der Cannizzaroschen Reaktion an Aldehyden hervorbringt. Parnas schreibt diese interessante und bis dahin neuartige, biologische Wirkung einem besonderen Ferment, der Aldehydmutase zu, während Battelli und Stern sie mit der Schmiedeberg'schen Oxydase identifizieren. Sie sind der Meinung, daß die in den früheren Versuchen gefundene Salicylsäure kein Produkt der Oxydation, sondern der Disproportionierung sei, daß also neben Salicylsäure die äquivalente Menge Saligenin entstanden sei. Sie identifizieren daher die Aldehydase mit der Aldehydmutase und sprechen ihr den Charakter einer Oxydase ab. Schon vorher war von Abelous in Gemeinschaft mit mehreren Mitarbeitern⁶⁾ in den nämlichen tierischen Organen ein Ferment angetroffen worden, das die Fähigkeit besitzt, die Oxydation von Aldehyden durch Nitrate und Chlorate katalytisch zu beschleunigen. Hierbei findet also gleichzeitig Oxydation und Reduktion statt, und daher wird das Ferment als Oxydo-Reduktase bezeichnet.

Andere Beziehungen zwischen diesen verschiedenen Fermentwirkungen wurden bisher nicht angenommen, nur Bach⁷⁾ vermutet, daß die Reduktions-

¹⁾ A. Pth. 14, 288 [1881]. ²⁾ ebenda 29, 386 [1891].

³⁾ Dabei muß hervorgehoben werden, daß schon Schmiedeberg die Wirkung des Fermentes nicht in einer Aktivierung des Sauerstoffes sah, sondern in einer, damals freilich nicht näher präzisierbaren Veränderung des Substrats. Die Schwierigkeit, mit der Phosphor in den Organen verbrannt wird, war besonders für diese Auffassung bestimmend.

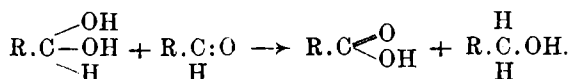
⁴⁾ Bio. Z. 28, 274 [1910]. ⁵⁾ Bio. Z. 29, 130 [1910].

⁶⁾ C. r. 136, 1573 [1903]; 137, 885 [1904]; 138, 382 [1904].

⁷⁾ Bio. Z. 31, 445 [1911]; siehe auch A. Bach, Oxydationsprozesse in der lebenden Substanz, in Oppenheimers Handbuch der Biochemie, Ergänzungsband 1913, S. 165.

wirkung der Aldehyde gegenüber Methylenblau zur Mutasereaktion in Beziehung stehe, da er in Leberbrei auch jene Wirkung vorgefunden hat. Die Oxydation von Aldehyden jedoch soll in den vereinzelt Fällen, wo man sie beobachtet hat, nach Battelli und Stern durch ein richtiges sauerstoff-aktivierendes Ferment, die Alkohol- bzw. Aldehyd-Oxydase, vermittelt werden¹⁾. Sie war zum erstenmal in den zitierten Untersuchungen von Schmiedeberg beobachtet worden; dort wurde auch neben der Salicylaldehyd-Oxydation die des Benzylalkohols zur Benzoesäure festgestellt.

Der mögliche Zusammenhang dieser verschiedenen Reaktionen auf Grund der Dehydrasenfunktion eines Fermentes ist vorhin kurz erörtert worden. Durch die Erkenntnis, daß Aldehyde in ihrer Hydratform dehydrierbar sind, erschließt sich auch der Mechanismus der Mutasereaktion dem Verständnis. Es liegt nahe, anzunehmen, daß sie dann eintritt, wenn ein zweites Molekül Aldehyd in seiner Anhydridform den bei der Dehydrierung frei werdenden Wasserstoff aufnimmt, als Wasserstoffacceptor fungiert:



Dann kommt zu den bisher festgestellten oxydations- und reduktions-beschleunigenden Äußerungen der Dehydrase als dritte die Mutasewirkung. Wie sich bei Gegenwart verschiedener Acceptoren das Endergebnis einer Dehydrierungsreaktion ausnimmt, ob wir die Erscheinungen einer Oxydation, einer Reduktion oder einer Disproportionierung erhalten, oder ob die Endprodukte eine Mischung des Effekts dieser Funktionen bilden werden, das hängt offenbar unter Berücksichtigung der Konzentrationsverhältnisse von der relativen Geschwindigkeit ab, mit welcher der aktivierte Wasserstoff von jedem der anwesenden Acceptoren aufgenommen wird. Für diese Folgerungen aus der Dehydrierungs-Theorie, daß nämlich entgegen allen herrschenden Annahmen Oxydase, Reduktase und Mutase ein und dasselbe Ferment, eine Dehydrase, sind, kann ich durch die vorliegende Untersuchung den Beweis am Beispiel einer typischen Dehydrase, an dem vielfach bearbeiteten Schardingerschen Enzym der Milch, erbringen.

Das Dehydrase-Ferment der Milch.

Schardinger hat bekanntlich vor 12 Jahren die Wahrnehmung gemacht²⁾, daß Methylenblau in roher Kuhmilch bei gelinder Wärme durch Aldehyde entfärbt wird, eine Reduktion, die für sich außerordentlich langsam erfolgt. Nach dem Aufkochen verliert die Milch

¹⁾ Bio. Z. 28, 145 [1910].

²⁾ Z. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußmittel 5, 22 [1902].

ihre reduktionsbeschleunigende Wirkung, und man kann daher mit dem sogen. »Methylenblau-Formaldehyd-Reagens« rohe und gekochte Milch von einander unterscheiden. Die anfänglichen Bedenken, ob man es in diesem Ferment wirklich mit einem genuinen Produkt der Milchdrüsen und nicht vielmehr mit Bakterienwirkung zu tun habe, wurden durch exakte Nachprüfung mit absolut steriler Milch, namentlich von Trommsdorff¹⁾, beseitigt. Ich selbst habe mit vollkommen aseptisch gewonnener Milch mich ebenfalls davon überzeugt, daß die von mir studierten Fermentwirkungen wirklich aus dem Tierkörper stammen. Von diesen Wirkungen war bisher nur die der Reduktion bekannt, die aber — Versuche nach dieser Richtung sind nicht weiter angestellt worden — selbstverständlich begleitet sein mußte von dem Übergang der dem entfärbten Farbstoff äquivalenten Aldehydmenge in die Säure. Über die Oxydase-Natur des Schardingerschen Enzyms, über seine Fähigkeit also, mit Hilfe des molekularen Sauerstoffs Aldehyde dehydrierend zu oxydieren, habe ich in der letzten Abhandlung eine kurze, auf nur einen Versuch gestützte Angabe gemacht. Dieser erste Befund ist jetzt durch viele Wiederholungen jenes Versuchs bestätigt worden. Was endlich die Mutasefunktion des Milchferments anbelangt, so habe ich gezeigt, daß Salicylaldehyd auch bei Luftausschluß in der Milch teilweise in Salicylsäure übergeführt wird. Der noch fehlende Nachweis, daß daneben die entsprechende Menge Saligenin entsteht, wird jetzt bei der Fortführung der Untersuchung erbracht. Es ist also mit Sicherheit dargetan, daß in der Milch drei typische Aldehydreaktionen, die an sich fast unmeßbar langsam verlaufen, stark beschleunigt werden, nämlich

1. die Reduktion chinoider Farbstoffe und auch von Nitraten²⁾ und Nitro-benzol³⁾,

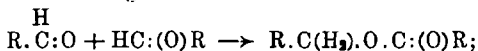
2. die Oxydation der Aldehyde zu Säuren durch den molekularen Sauerstoff und zwar naturgemäß in Fällen, wo sie an sich eine minimale Geschwindigkeit hat, und

3. die intermolekulare Zerteilung zweier Moleküle Aldehyd in Säure und Alkohol (Cannizzarose Reaktion)⁴⁾.

¹⁾ Zentralbl. f. Bakt. 49, 291 [1909]. ²⁾ Bach, Bio. Z. 33, 282 [1911].

³⁾ Ich habe bei Anwendung von Nitrobenzol als Acceptor in kleinen Mengen Anilin erhalten.

⁴⁾ Die wahre Cannizzarose Reaktion (mit starkem Alkali) denke ich mir so verlaufend, daß als erstes Reaktionsprodukt infolge verschobener Aldolkondensation der Ester gebildet wird:



er wird dann weiter verseift.

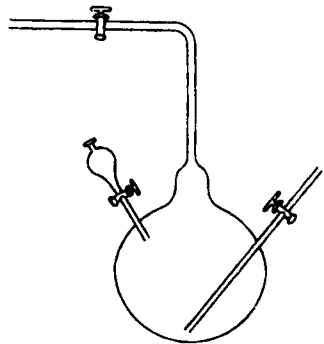
Nach den seitherigen Ergebnissen, die über die Natur der Dehydrierungs-Vorgänge gewonnen sind, ist die Wahrscheinlichkeit, daß diese drei katalytischen Funktionen durch ein Ferment, durch die Dehydrase, geleistet werden, eine sehr große.

Ein exakter und fest gegründeter Beweis für diese Einheit war dann zu erbringen, wenn gezeigt werden konnte, daß die drei Reaktionen, die wir im Auge haben, nicht ohne Zusammenhang — wie dies bei mehreren Fermenten der Fall sein müßte — neben einander herlaufen, daß sie vielmehr in einem Abhängigkeitsverhältnis von einander stehen, das der quantitativen Untersuchung zugänglich ist. Bei allen drei Reaktionen handelt es sich nach der hier vertretenen Theorie um die Wegnahme von Wasserstoff durch verschiedene Acceptoren. Die Aufnahme des Wasserstoffs durch einen Acceptor, deren Chemismus bestimmbar ist, muß eine Änderung erfahren, wenn sich gleichzeitig im Reaktionssystem ein zweiter Wasserstoffacceptor befindet.

Die Sachlage wird durch folgende Erläuterung des einfachsten und wichtigsten Falles ohne weiteres klar. Wenn wir eine Lösung von Salicylaldehyd in Milch in reiner Stickstoffatmosphäre der Wirkung des Fermentes überlassen, erhalten wir eine bestimmte Menge von Salicylsäure und Saligenin; hier wirkt nur der Aldehyd selbst als Dehydrogenisator. Lassen wir unter sonst genau gleichen Bedingungen die Reaktion mit der gleichen Milch in Gegenwart von Luft oder Sauerstoff vor sich gehen, so entsteht mehr Salicylsäure. Wäre dieses Plus auf Rechnung einer neben der Mutase vorhandenen Oxydase zu setzen, so müßte neben mehr Salicylsäure die gleiche Menge Saligenin wie im sauerstofflosen Parallelversuch erhalten werden. Dies ist aber nicht der Fall. Vielmehr nimmt das Saligenin mit dem Ansteigen der Salicylsäureausbeute ab. Die Erklärung für diese Beobachtung kann nur die sein, daß sich an der Dehydrierungsreaktion, die in Stickstoffatmosphäre nur mit einem zweiten Molekül Salicylaldehyd als Wasserstoffacceptor verläuft, gleichzeitig auch der Sauerstoff beteiligt und zwar gemäß der durch seine Hydrierungskonstante und Konzentration bestimmten Reaktionsgeschwindigkeit. Durch diese Beteiligung steigert der Sauerstoff den Umsatz der Dehydrierungsreaktion; die Menge der gebildeten Säure erhöht sich; gleichzeitig wird dabei der Mutasereaktion ein Teil der reagierenden, d. h. aktivierten Aldehydhydrat-Moleküle entzogen: der Ertrag an Saligenin vermindert sich. Die folgenden Versuche mögen dies erläutern. Vor ihrer Wiedergabe muß aber die Methodik der Untersuchung besprochen werden.

Die Methodik der Versuchsanordnung.

Die Schwierigkeiten, Salicylsäure, Salicylaldehyd und Saligenin aus der Milch möglichst quantitativ von einander abzutrennen, wurden nach sehr vielen Versuchen in einem für den vorliegenden Zweck ausreichenden Grad überwunden. Da die Milch kein stabiles Versuchsmaterial darstellt, vielmehr in ihrem Fermentgehalt, wenn auch innerhalb relativ kleiner Grenzen, wechselt, so wurden alle zum direkten Vergleich dienenden Versuche jeweils im Laufe des Vormittags mit der gleichen Milch angestellt. Als Gefäße dienten Rundkolben von 750 ccm Inhalt mit seitlich angeschmolzenem Gas-Einleitungsrohr; an einem oben angeschmolzenen, rechtwinklig umgebogenen Rohr durch Klammern gehalten, wurden sie in den Thermostaten eingehängt. Den weiter verbesserten Apparat, der zu den späteren Versuchen benützt wurde, veranschaulicht die nebenstehende Skizze. Der kleine, seitlich angebrachte Tropftrichter dient dem Einbringen des Aldehyds oder anderer Reagenzien in den evakuierten oder mit einem bestimmten Gas gefüllten Kolben. Für die Versuche in Stickstoff (Mutase-reaktion) wurde die Milch im Vakuum bei 30° etwa 5 Minuten lang ausgekocht, dann füllte man mit reinem, über Hydro-sulfit stehendem Stickstoff, evakuierte nochmals und ließ dann wiederum Stickstoff ein. Im übrigen ließ man die verwendeten Gase (Stickstoff, Luft, Sauerstoff) durch das seitlich angeschmolzene Rohr in sehr langsamem Strom durch die Milch hindurchgehen. Bei kinetischen Versuchen, von denen unten die Rede sein wird, wurden zum Zwecke der Entnahme von Milchproben die beiden Hähne geschlossen, die Gaszuleitung wurde dann in das obere Rohr verlegt und dann die erforderliche Menge Milch aus dem Seitenrohr in ein Meßgefäß gedrückt.



Zur Aufarbeitung der Reaktionsprodukte wurde nach Beendigung des Versuchs aus der noch heißen Milch mit 4-n. Schwefelsäure (5 ccm auf 100 ccm Milch) das Casein ausgefällt, dem man über Nacht Zeit zum Absitzen ließ. Dann wurde durch reines, vorher ausgekochtes Koliertuch, das durch ein Gummiband festgehalten war, in ein Becherglas filtriert; von dem noch schwach getrübbten Filtrat wurde eine abgemessene Menge im Scheidetrichter mit Äther ausgeschüttelt, gewöhnlich 150 ccm; viermaliges Ausschütteln erwies sich als genügend, wobei für 150 ccm Filtrat nach einander 120, 100, 80, 50 ccm Äther genommen wurden. Emulsionen lassen sich bei vorsichtigem Schütteln fast vollständig vermeiden. Die vereinigten Ätherauszüge trocknet man kurz über Natriumsulfat und engt sie dann auf ca. 10 ccm ein. Dieser Rest wird quantitativ unter Nachspülen mit Äther in Stöpselflaschen von 30 ccm Inhalt gebracht, darin vorsichtig auf 5 ccm eingedampft (Siede-

steine!) und dann zur Entfernung des Salicylaldehyds mit 15 ccm¹⁾ Bisulfittlösung 15 Stunden auf der Maschine geschüttelt. Besondere Versuche zeigten, daß hierbei der Salicylaldehyd (0.2–0.4 g in 5 ccm Äther) bis auf verschwindend kleine Mengen von 0.5–1.5 mg aus dem Äther herausgenommen wird. Auf der andren Seite wird Salicylsäure auch nicht in Spuren in der Bisulfittlösung als Salz gebunden.

Die Ätherlösung, die die Salicylsäure und das Saligenin enthält, trennt man jetzt in einem kleinen Tropftrichter ab. Dabei wird die Bisulfittlösung noch zweimal mit 15 und 10 ccm frischen Äthers ausgeschüttelt. Aus den vereinigten Ätherauszügen zieht man dann durch wiederholtes Ausschütteln mit Natriumbicarbonat, das man in wenig Wasser suspendiert und in 4 Portionen zugibt, die Salicylsäure aus, die wäßrigen Auszüge müssen zur vollständigen Entfernung gelösten Saligenins noch zweimal mit 10 und 5 ccm frischen Äthers behandelt werden; man fügt ihn der Hauptlösung zu.

Die Salicylsäure wird durch vorsichtige Zugabe von 4-n. Schwefelsäure in Freiheit gesetzt und durch viermaliges Ausschütteln mit je 6 ccm in Äther gebracht. Der mit Natriumsulfat getrocknete Äther hinterläßt nach dem Eindampfen in einem kleinen Bechergläschen die Salicylsäure in vollkommen reinem Zustand. Wegen ihrer Flüchtigkeit darf nicht ganz zur Trockne eingedampft werden, man nimmt daher den Rest des Äthers im Vakuumexsiccator weg. Die quantitative Bestimmung kann durch Wägung oder durch Titration erfolgen; die Säure wird so rein gewonnen, daß man auf beiden Wegen zu denselben Werten gelangt. Der Bequemlichkeit wegen wurde meist mit sehr wenig *p*-Nitrophenol als Indicator titriert, nachdem man die krystallisierte Säure vorher in heißem Wasser gelöst hatte.

Das Saligenin, das oben in der Ätherlösung zurückblieb, wird ihr mit 5-prozentiger Natronlauge entzogen, die man in kleinen Mengen zu je 4 ccm in vierfacher Wiederholung zur Ausschüttelung verwendet. Um diese alkalischen Lösungen, die durch die geringen Spuren zurückgebliebenen Salicylaldehyds meist hellgelb gefärbt sind, ganz blank zu erhalten, werden sie mit 10 ccm frischen Äthers durchgeschüttelt. Nach einigem Stehen kann man abtrennen; dem Äther wird nochmals mit wenig Natronlauge etwa zurückgebliebenes Saligenin entzogen, dann säuert man die völlig klare alkalische Lösung mit 4-n. Schwefelsäure eben an. Eine durch ausgeschiedene Fettsäuren hervorgerufene geringe Trübung formt sich nach halbtägigem Stehen der Lösungen zu einem feinen Niederschlag, der durch ein kleines, feinporiges, nicht angefeuchtetes Filterchen abfiltriert wird (nicht nachwaschen). Das wasserklare Filtrat wird dann wie oben bei der Isolierung der Salicylsäure 4-mal ausgeäthert; die mit Natriumsulfat getrockneten Auszüge dampft man in kleinen tarierten Bechergläsern von etwa 15 ccm Inhalt auf dem Wasserbad vorsichtig ein und bringt das Saligenin nach 6-stündigem Verweilen im Vakuum über Ätzkali und Schwefelsäure zur Wägung. Bei genauer Einhaltung der gegebenen Methode wird das Saligenin sofort in schöner Krystalli-

¹⁾ Für mehr als 0.4 g Aldehyd ist eine größere Menge Bisulfittlösung nötig.

sation rein gewonnen; es löst sich klar im Wasser und ist vollkommen frei von Salicylsäure.

Im Gang der Untersuchung stellte sich das Bedürfnis heraus, auch dieses krystallisierte Saligenin scharf auf seine Reinheit zu prüfen und in nicht absolut reinen Präparaten den Gehalt an Saligenin genau zu ermitteln. Hr. P. Böhm hat auf meine Veranlassung ein Verfahren ausgearbeitet, das sich aufs beste bewährt hat. Man setzt das Rohsaligenin in ca. 0.4% wäßriger Lösung mit einem kleinen Überschuß $2\text{--}3/_{10}\text{-n.}$ -Bromwassers um, gibt nach 20 Sekunden einige Tropfen Jodkaliumlösung zu und titriert mit $1/_{10}$ -Thiosulfat auf Entfärbung zurück. Es ist bekannt¹⁾, daß bei dieser Bromierung des Saligenins neben einander Dibrom-saligenin und Tribrom-phenol entstehen. Es hat sich gezeigt, daß der Bromtiter des Saligenins unter den angegebenen Umständen ein absolut konstanter ist, und daß stets 5.38 Äquivalente Brom verbraucht werden.

Beleganalysen: Prüfung auf konstanten Bromverbrauch. Je 5 ccm einer Saligeninlösung verbrauchten 2.95, 2.90 und 2.92 ccm Bromwasser.

Je 5 ccm einer 0.4012-prozentigen Lösung wurden mit 5 ccm $3/_{10}\text{-n.}$ Bromwasser versetzt; nach Zugabe von einigen Tropfen gesättigter Jodkaliumlösung wurde mit $1/_{10}$ -Thiosulfat zurücktitriert. Verbrauch 6.3, 6.15, 6.4 ccm, im Mittel 6.28. Es wurden daher 8.72 ccm $1/_{10}$ -Bromlösung von 0.0200 g Saligenin verbraucht. 1 ccm $1/_{10}$ -Bromlösung entspricht 0.0023 g Saligenin.

Nun ist es aber nicht möglich, die Salicylsäure und das Saligenin bei den hier zu besprechenden Versuchen vollständig aus der Milch heraus zu holen. Wie bereits Dony-Hénault und van Duuren²⁾ und auch andre Autoren bemerken, bleibt bei Extraktionen aus Organsäften und dergl. immer viel Salicylsäure zurück, und ich habe in mehreren Kontrollversuchen, bei denen die in Betracht kommenden Mengen einige Stunden in Milch auf 60° erwärmt und dann wieder herausgearbeitet wurden, stets nur die in allen Versuchen fast konstante Menge von 60–65% des Einsatzes zurückerhalten. Da hier immer Parallelversuche diskutiert werden, für deren ausgezeichnete Übereinstimmung der unten stehende Belegversuch bürgt, so tut das Manko an Salicylsäure der Brauchbarkeit der Methode keinen Abbruch.

Das Saligenin wird zu rund 90% zurückerhalten und zwar auf Grund mehrerer blinder Ansätze stets in diesem gleichen Verhältnis. So klärten sich die zu Beginn der Untersuchung lange unverständlichen Ergebnisse auf, daß nämlich bei den Versuchen in

¹⁾ Auwers und Büttner, A. 302 [1898].

²⁾ Travaux de l'Institut Solvay 1907, 56; Bull. Acad. roy. de Belg. 1907, 537.

Stickstoff, bei denen Salicylsäure und Saligenin im äquivalenten Verhältnis (11 : 10) zu erwarten waren, immer 20—25% mehr Saligenin als Säure gefunden wurden. Berücksichtigt man die obigen Ausbringungskoeffizienten (65% und 90%), so kommt man zu stimmenden Resultaten.

Die ganze Beweisführung für die hier aufgestellten Thesen beruht auf der Unveränderlichkeit der Salicylsäure und des Saligenins gegenüber den anwesenden Stoffen; es waren daher absolut einwandfreie Belege nach dieser Richtung nötig. Denn wenn z. B. Saligenin durch Sauerstoff für sich schon oder in der Milch oxydiert oder dehydriert würde, so stünde es um den Beweis von der Einheit von Mutase, Oxydase und Reduktase schlecht. In Wirklichkeit erfährt Saligenin in der Milch keinerlei Veränderung, das Gleiche gilt von der Salicylsäure, wenigstens insofern als bei kontrollierenden Parallelversuchen in Stickstoff und in Sauerstoff genau die gleichen Mengen wieder isoliert werden. Von mehreren Kontrollen, die angestellt wurden, gebe ich das Ergebnis eines Serienversuches wieder, der neben dem Beweis der absoluten Unveränderlichkeit der beiden Substanzen gleichzeitig ein gutes Bild davon gibt, mit welcher befriedigender Übereinstimmung sie nach der beschriebenen Methode aus der Milch isoliert werden können. Der Versuch zeigt jeweils in vier Bestimmungen, daß die Salicylsäure sowohl aus Stickstoff- wie aus Sauerstoff-Milch zu 65%, das Saligenin zu 90% zurückerhalten werden.

0.150 g Salicylsäure im 25-cm-Meßkolben in der Wärme gelöst; von der warmen Lösung wurden je 10 cm herauspipettiert zu je 400 cm Milch, die in Stickstoff- und Sauerstoff-Atmosphäre im Thermostaten bei 60° gehalten wurden. Ebenso wurde mit einer Lösung von 0.139 g Saligenin in 25 cm Wasser verfahren. Nach 2½ Stunden wurden je 200 cm entnommen; nach 6 Stunden der Rest aufgearbeitet. Es wurden isoliert (auf 200 cm Milch umgerechnet):

	nach 2½ Stunden		nach 6 Stunden	
	Salicylsäure	Saligenin	Salicylsäure	Saligenin
aus dem Stickstoff-Versuch	0.0185	0.0244	0.0200	0.0230
» » Sauerstoff- »	0.0180	0.0235	0.0180	0.0230

Eingesetzt sind 0.030 g Salicylsäure und 0.0275 g Saligenin.

Die angegebenen Saligeninwerte sind die durch Titration mit Brom ermittelten: sie sind also absolut genau. Es ist vielleicht nicht überflüssig, hier auch die gewogenen Mengen wiederzugeben, da die Differenz für die ganze Methode charakteristisch ist.

So wurden für die beiden Saligeninbestimmungen im Stickstoff 0.0127 g und 0.0142 g gewogen, 0.0127 g und 0.0122 g titriert; für die in Sauerstoff 0.0127 g und 0.0156 g gewogen, 0.0121 g und 0.0138 g titriert. (Die Volumina der ausgeätherten Milch waren nicht gleich.)

Salicylaldehyd ist; was Schmiedeberg schon feststellte, auch bei höherer Temperatur fast vollkommen unempfindlich gegen Sauerstoff. Methylenblau in Milch wird weder durch Saligenin, noch durch Salicylsäure entfärbt, so daß man auch für das Studium der Reduktionswirkung auf sicherer Grundlage steht.

Die mit Absicht in allen Einzelheiten beschriebene Methode ist umständlich und verlangt bei den vergleichenden Versuchen, um die es sich hier handelt, eine absolut gleichmäßige Durchführung. Ein einziger Fehler stürzt den ganzen Versuch, was für die Durchführung einer zusammenhängenden Serie von neun Ansätzen mit 18 Bestimmungen, wie sie weiter unten beschrieben werden, zuweilen recht fatal war.

Bei allen experimentellen Angaben in der vorliegenden Abhandlung sind die Ausbeuten an Salicylsäure und Saligenin stets auf 200 ccm Milch bezogen. Die Versuchstemperatur war überall die optimale von 60°.

Der Salicylaldehyd wurde, was schließlich auch noch erwähnt sei, über die Bisulfidverbindung gereinigt, im Vakuum scharf fraktioniert und unter Stickstoff eingeschmolzen aufbewahrt.

Nachdem jetzt die Voraussetzungen für die analytische Behandlung des Gegenstands diskutiert und als brauchbar befunden sind, gebe ich einige Versuche, die dartun sollen:

Erstens, daß bei Gegenwart von Luft oder Sauerstoff mehr Salicylsäure gebildet wird, als in Stickstoff allein, daß also neben der Mutasewirkung die einer Oxydase in der Milch besteht (A) und zweitens, daß Mutase und Oxydase ein und dasselbe Ferment sind (B), vergl. dazu oben S. 2090. Die Versuchsanordnung war wie beschrieben. Die Konzentration des Aldehyds betrug 0.1%, die Temperatur, wie bei allen Versuchen, 60°.

		Salicylsäure			
A.		nach 60 Minuten		nach 270 Minuten	
in	Stickstoff	0.013		0.021	
»	Luft	0.017		0.033	
»	Stickstoff	0.012		0.019	
»	Sauerstoff	0.025		0.033	
B.		nach 120 Minuten		nach 360 Minuten	
		Salicylsäure	Saligenin	Salicylsäure	Saligenin
in	Stickstoff	0.015 [0.023]	0.020 [0.022]	0.023 [0.035]	0.025 [0.028]
»	Luft	0.025 [0.037]	0.017 [0.020]	0.032 [0.048]	0.020 [0.022]
»	Sauerstoff	0.030 [0.045]	0.014 [0.016]	0.033 [0.050]	0.012 [0.014]

Die eingeklammerten Zahlen sind die unter Anwendung der Ausbringungskoeffizienten berechneten Werte; sie dürften ungefähr den wirklichen Umsatz wiedergeben. Im übrigen sind die in dieser Arbeit aufgeführten Daten unkorrigiert.

Wir sehen also aus dem Versuch A, daß bei Gegenwart von Luft und namentlich von Sauerstoff die Ausbeute an Salicylsäure erheblich zunimmt, aus B, daß gleichzeitig weniger Saligenin gebildet wird. Die Mutasewirkung des Ferments hat also durch den Zutritt des Luftsaauerstoffs eine deutliche Einschränkung erfahren. Dasselbe Bild bot sich bei den vielen Wiederholungen dieser vergleichenden Versuche, wofür sich weiterhin viele Belege finden.

Die zweite Kombination, die zu studieren war, ist die der Mutation und Reduktion. Wenn hier zwei verschiedenartige Fermente in Frage kämen, so mußte neben der eigentlichen Scharingerschen Reaktion der Methylenblau-Entfärbung, bei der aus dem Salicylaldehyd Salicylsäure entsteht, die Disproportionierung nebenher laufen, d. h. man mußte gleichzeitig etwa die bei B in Stickstoff gefundene Menge Saligenin erhalten. Die Konzentration des Aldehyds war bei den Versuchen eine hierfür ausreichende, und daß Saligenin in der Milch gegenüber Methylenblau ohne jede Einwirkung ist, wurde schon oben angegeben. Die Hydrierungsgeschwindigkeit von Methylenblau durch Salicylaldehyd in der Milch ist eine sehr große. So wurden bei einem Parallelversuch mit 300 ccm Milch und einem Gramm Salicylaldehyd mit $\frac{1}{30}$ -Methylenblaulösung¹⁾ unter Stickstoff 0.280 g Salicylsäure (bezogen auf 200 ccm Milch) erhalten, während Luft gleichzeitig nur 0.0869 g gab. Die Farbstofflösung ließ man derart zufließen, daß die Milch dauernd deutlich blau gefärbt war. Von den verwandten 145 ccm war ein Teil im Überschuß da, d. h. er wurde nicht mehr verbraucht. Saligenin war bei diesem Versuch nur in geringen Spuren colorimetrisch nachzuweisen. Bei einem Parallelversuch mit geringerer Aldehydkonzentration, 0.5 g auf 400 ccm Milch, der gleichzeitig nebenan in Sauerstoff ging, isolierte man nach 6 Stunden 0.125 g und 0.040 g Salicylsäure (neben 0.011 g Saligenin).

Bei einem dritten Versuch wurde auch in der Methylenblau-Milch das Saligenin rein isoliert und quantitativ bestimmt; es wurden dabei in 200 ccm Milch 0.238 g Salicylsäure und daneben 0.003 g kristallisiertes Saligenin erzeugt.

Diese Versuche lehren, daß durch die außerordentlich große Geschwindigkeit, mit der das Methylenblau den durch das Ferment aktivierten Wasserstoff wegnimmt, die Mutasereaktion völlig in den

¹⁾ 12 g (von Chlorzink freier) Farbstoff im Liter.

Hintergrund gedrängt wird. Daß hierfür nicht etwa eine Schädigung eines besonderen Mutasefermentes durch das Methylenblau verantwortlich gemacht werden kann, geht aus Folgendem hervor.

300 ccm Milch, in die 1.7 g Salicylaldehyd hineingeschüttelt waren, wurden bei 60° unter Stickstoff mit 45 ccm $\frac{1}{30}$ -Farbstofflösung versetzt; nach etwa einer halben Stunde war die Lösung entfärbt; der Versuch ging noch 6 Stunden unter Stickstoff weiter. Die Aufarbeitung ergab (wie immer für 200 ccm Milch) 0.086 g Säure und 0.027 g krystallisiertes, nicht völlig reines Saligenin.

Man sieht daraus, daß nach dem Verbrauch des Methylenblaus das Ferment seiner disproportionierenden Funktion weiter nachgehen kann.

Die Wiederholung des Versuches zum Zweck der genauen Saligeninbestimmung ergab mit 1 g Salicylaldehyd auf 300 ccm Milch und mit 50 ccm $\frac{1}{30}$ -Blaulösung unter sonst gleichen Bedingungen 0.086 g Salicylsäure und 0.028 g Saligenin (krystallisiert gewogen und mit Brom titriert).

Über die normale Saligeninausbeute bei dieser Aldehydkonzentration vergl. unten S. 2105.

Die Schädigung des Dehydrase-Fermentes.

Im Vorstehenden ist dargetan worden, daß die verschiedenen katalytischen Wirkungen gegenüber typischen Aldehydreaktionen, die der Milch eigen sind, auf ein dehydrierendes Ferment zurückgeführt werden müssen. Es ist schon durch frühere Arbeiten bekannt, daß das Schardingersche Enzym labil ist, daß es speziell durch Formaldehyd und durch Methylenblau stark geschädigt und rasch zerstört wird. Diese Tatsache äußert sich ja auch bei allen bisher angegebenen Versuchen, wo Mutasereaktion, Oxydation und Farbstoffreduktion einen verhältnismäßig beschränkten Umsatz erreichten und ziemlich rasch zum Aufhören kamen. Für die Kinetik der Fermentwirkung, die sich freilich nur in groben Zügen studieren ließ, war es von Wichtigkeit, das Wesen dieser schädigenden Einflüsse etwas näher kennen zu lernen. Namentlich ergab sich dabei die Möglichkeit, die Einheit des Fermentes weiter zu prüfen; denn eine Schädigung, die sich zeitlich verfolgen ließ, mußte die drei hier untersuchten Wirkungen in quantitativ gleicher Weise treffen. Für verschiedene Fermente war dies aber nicht zu erwarten. Ich werde zeigen, daß die gemachten Beobachtungen den Erwartungen entsprachen.

Unter den Bedingungen, die hier fast durchweg zur Anwendung kamen (Temperatur 60°, Aldehydkonzentration: 0.5 g auf 500 ccm Milch), ist in der Milch in Stickstoffatmosphäre die Wirksamkeit des Fermentes nach 3—4 Stunden sehr merklich abgefallen. Aber noch nach 10 Stunden ist sie vermöge der sehr empfindlichen Methylenblau-

reaktion noch in geringem Maße zu konstatieren. In Luft verläuft der Abfall unter sonst gleichen Bedingungen merklich rascher, nach 6 Stunden ist das Ferment total vernichtet. Sauerstoff setzt dem Ferment schon nach 1-stündiger Einwirkung sehr stark zu, nach 2 Stunden hat er alle Wirkungen der Dehydrase aufgehoben. Durch überschüssiges Methylenblau endlich wird die Fermentwirkung schon nach 1 Stunde vollkommen zum Stillstand gebracht. — Der angegebene Grad der Schädigung stellt sich also bei gleichzeitiger Gegenwart von Salicylaldehyd ein.

Erhöhte Temperatur für sich allein schädigt nur wenig, was die zwei nachstehenden Versuche zeigen.

1. Für die Mutase-Reaktion.

300 ccm Milch wurden unter Stickstoff 270 Minuten auf 60° gehalten; dann gab man 100 ccm 0.5-proz. Salicylaldehydlösung zu und ließ noch 210 Minuten bei der gleichen Temperatur. Dabei wurden (auf 200 ccm Milch umgerechnet) 0.015 g Salicylsäure und 0.011 g Saligenin isoliert, also nicht sehr viel weniger wie in den Versuchen mit nicht vorher erwärmter Milch (hierbei beträgt der Durchschnitt an gebildeter Salicylsäure 0.020 g).

2. Für die Oxydase-Reaktion.

Bei dem gleichen Ansatz wie eben wurde nach 4 $\frac{1}{2}$ -stündiger Erwärmung unter Stickstoff dieses Gas durch Sauerstoff ersetzt, nach 3 $\frac{1}{2}$ Stunden waren 0.019 g Säure und 0.008 g Saligenin auf 200 ccm Milch gebildet.

Schädigung durch Sauerstoff. Durch Erwärmen bei Gegenwart von Sauerstoff leidet das Ferment erheblich stärker. Gleichzeitig mit dem ersten der beiden soeben beschriebenen Versuche wurde die gleiche Milch ebenso lange unter Sauerstoff erwärmt; hier lieferte der zugefügte Aldehyd nach 3 $\frac{1}{2}$ Stunden nur 0.006 g Säure und 0.003 g Saligenin; bei dem Parallelversuch zu 2, ebenfalls ganz unter Sauerstoff, 0.004 g Säure und 0.002 g Saligenin.

Auch schon bei geringerer Sauerstoffkonzentration, in Luft, ist der schädigende Einfluß deutlich zu erkennen.

Je 300 ccm Milch wurden unter Stickstoff und unter Luft 4 Stunden lang auf 60° erwärmt; dann wurde nach Zugabe von je 1 g Salicylaldehyd noch 3 $\frac{1}{2}$ Stunden lang auf der gleichen Temperatur gehalten.

Der Versuch unter Stickstoff lieferte 0.021 g Salicylsäure, der unter Luft 0.017 g. Die durchschnittlichen Mengen ohne Vorerwärmung sind 0.030 g und 0.040 g.

Wir finden also die Angaben früherer Autoren, nach denen Reduktions- und Mutase-Fermente durch Sauerstoff geschädigt werden, auch bei der Milch-Dehydrase bestätigt. Vergl. dazu auch im folgenden Kapitel S. 2106.

Hier interessiert uns noch die qualitative Feststellung, daß durch die Vorerwärmung der Milch in Sauerstoff bzw. Luft auch die Reduktionswirkung gegenüber Methylenblau leidet.

Es wurden, wie oben, im Parallelversuche je 300 ccm Milch unter Stickstoff und unter Luft $4\frac{1}{2}$ Stunden lang bei 60° gehalten; die Luft im zweiten Kolben wurde dann durch Stickstoff ersetzt, jeder Kolben erhielt 1 g Salicylaldehyd, und man ließ hierauf in beide Kolben $\frac{2}{30}$ -Methylenblaulösung tropfen. Es war sofort zu sehen, daß bei Zugabe gleicher Mengen der Farbstoff in der Stickstoffmilch viel rascher entfärbt wurde, als in der mit Luft vorerwärmten. Nach $3\frac{1}{2}$ -stündiger Einwirkung, wobei immer für einen Überschuß an Methylenblau gesorgt war, wurden vom Inhalt beider Kolben die üblichen Mengen auf Salicylsäure verarbeitet. Es wurden erhalten **0.121 g** (Stickstoff) und **0.084 g** (Luft).

Die quantitative Messung der schädigenden Einflüsse.

Der zeitliche Verlauf der Salicylsäure-Produktion unter Stickstoff und unter Sauerstoff gibt offenbar an, in welchem Maßstab das Ferment bei der Mutase- und Oxydase-Reaktion geschädigt wird. Bestimmt man in gewissen Abständen die in der Milch gebildete Salicylsäure, so kann man dadurch mit einiger Genauigkeit ermitteln, in welchem Umfang die Wirkung des Fermentes nachläßt bzw. nachgelassen hat. Ist die Säuremenge bei einer Bestimmung die gleiche geblieben, wie bei der vorhergehenden, so hat bei diesem Zeitpunkt das Ferment aufgehört, wirksam zu sein. Mit Hilfe einer genügenden Anzahl solcher Einzelbestimmungen kann man daher für die Mutase- und Oxydase-Reaktion, d. h. für das Ferment in Stickstoff- und in Sauerstoff-Atmosphäre, seine Wirkungsdauer und den Verlauf seiner Inaktivierung feststellen. Aber auch die Reduktionswirkung gegenüber Methylenblau muß, da sie ja durch das gleiche Ferment vermittelt wird, im gleichen Tempo nachlassen und im gleichen Zeitpunkt aufhören, wie die beiden andren Reaktionen. Dieses ist auch der Fall. Ehe wir die Methode, die zu dieser Feststellung benutzt wurde, beschreiben, seien die Versuche, die den Schädigungsverlauf für die beiden zuerst besprochenen Reaktionen illustrieren, wiedergegeben.

Je 500 ccm der gleichen Milch wurden mit je 100 ccm 0.5-proz. Aldehydlösung in Thermostaten bei 60° gehalten und zwar in Stickstoff, Luft und Sauerstoffatmosphäre. Nach $1\frac{1}{2}$ —2 Stunden wurden jedem Kolben 200 ccm entnommen und darin Säure und Saligenin bestimmt. Nach der gleichen Zeit wurde eine zweite Probe entnommen, der Rest wurde nach 7—8 Stunden aufgearbeitet.

Ein Versuch, der mit 18 Bestimmungen in allen Phasen glückte, gab folgendes Bild:

	Nach 90 Minuten		Nach 220 Minuten		Nach 500 Minuten	
	Salicylsäure	Saligenin	Salicylsäure	Saligenin	Salicylsäure	Saligenin
Stickstoff . .	0.017	0.020	0.024	0.032	0.026	0.031
Luft	0.020	0.018	0.030	0.026	0.031	0.026
Sauerstoff . .	0.033	0.015	0.040	0.016	0.038	0.015

Das Ergebnis eines zweiten Tripelversuches enthält die nach stehende Tabelle:

	Nach 120 Minuten		Nach 270 Minuten		Nach 500 Minuten	
	Salicylsäure	Saligenin	Salicylsäure	Saligenin	Salicylsäure	Saligenin
Stickstoff . .	0.016	0.020	—	—	0.021	0.024
Luft	0.023	0.018	0.030	0.020	0.030	0.021
Sauerstoff . .	0.030	0.014	0.030	0.012	0.030	0.010

Für die Saligeninwerte ist zu bemerken, daß sie nicht durch Titration mit Brom kontrolliert sind; in der Größenordnung sind sie aber sicherlich zuverlässig.

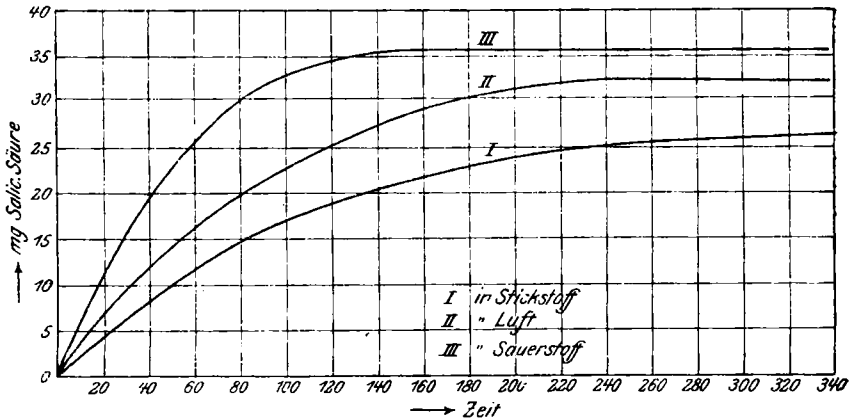
Die beiden Versuche lassen deutlich erkennen, wie sich die Wirksamkeit des Ferments in den Sauerstoffversuchen sehr rasch erschöpft, wie sie in Stickstoff länger anhält und wie in Luft die Schnelligkeit der Abminderung etwa die Mitte zwischen den beiden unvermischten Gasen hält.

Eine große Anzahl von Doppelversuchen (Stickstoff-Luft und Stickstoff-Sauerstoff) hat weiter dem Zweck gedient, den Verlauf der Reaktionen innerhalb anderer Zeitintervalle festzulegen. Es liegen im ganzen 36 Salicylsäurebestimmungen vor aus Versuchen, bei denen die Aldehydkonzentration 0.1% betrug. Sie ergeben ohne allzu große Abweichungen für die einzelnen Zeiten Mittelwerte, die die Salicylsäurebildung durch die nachstehenden Kurven auszudrücken erlauben. Auf der Ordinate sind die Salicylsäuremengen in Milligrammen, auf der Abszisse die Zeiten in Minuten angegeben.

Man sieht ohne weiteres, daß die Reaktion nicht gemäß dem Massenwirkungsgesetz vor sich geht, nach dem die Salicylsäuremengen jeweils der Aldehydkonzentration — die sich nur wenig verändert — proportional sein sollten. Zum mindesten ist eine Annäherung an diese Beziehung nur in der Anfangszeit vorhanden. Die Kurve I

wird von 220 Minuten an merklich flacher, behält aber einen, wenn auch geringen Anstieg bei. II verflacht sich von 180 an und geht nach 240 Minuten fast vollkommen in die Horizontale über, ein Verlauf, der bei III schon nach 110 Minuten eintritt.

0.2 g Salicylaldehyd in 200 ccm Milch bei 60°.



Wir haben gesehen, daß der anormale Gang der Kurven durch die besprochenen Fermentschädigungen bedingt ist, die oben im einzelnen experimentell behandelt worden sind. Bemerkenswert ist die heftige Wirkung des Sauerstoffs. Trotz ihr ist jedoch hier die Säureproduktion durch dieses »Gift« im ganzen Reaktionsgang die größte.

Die Schädigung der Dehydrase gegenüber der Methylenblau-Reduktion.

Wenn die hier behandelten Reaktionen durch ein und dasselbe Ferment der Milch beschleunigt werden, so muß mit der Abnahme der Aktivität gegenüber der Salicylsäureproduktion, wie sie eben behandelt wurde, die der Methylenblau-Entfärbung im gleichen Schritt geben. In dem Maße, als unter der Wirkung des Ferments in der Milch weniger Salicylsäure entsteht, muß auch ihre Entfärbungskraft abnehmen, und in den Zeitpunkten der völligen Passivität, die vorhin bestimmt wurden, darf Methylenblau überhaupt nicht mehr entfärbt werden. Um einen Maßstab für die Quantität der Reduktionswirkung zu erhalten, hat es sich als praktisch erwiesen, eine bestimmte Norm einzuführen. Ich messe das Reduktionsvermögen in der Weise, daß ich 20 ccm Milch, in der 0.020 g Salicylaldehyd gelöst sind (0.2 g in 200 ccm Milch eingeschüttelt), mit 10 ccm $\frac{1}{300}$ -Methylenblau-Lösung versetze und dann in Stickstoffatmosphäre 5 Minuten lang im Ther-

mostaten auf 60° erhitzte. Dann wird sofort mit einer auf Methylenblau eingestellten Natriumhydrosulfit-Lösung der nicht reduzierte Farbstoff zurücktitriert. Durch eine einfache Umrechnung ergibt sich die Farbstoffmenge, die ein Liter Milch unter den angegebenen Verhältnissen reduzieren kann; ich drücke sie in ccm $\frac{1}{100}$ -Lösung aus und bezeichne diese Zahl als »Methylenblau-Zahl«. Eine Milch, die beispielsweise nach der Probe 8 ccm $\frac{1}{300}$ -Farbstoff-Lösung reduziert, hat demnach die Methylenblau-Zahl $\frac{8 \times 50}{3} = 133$.

Die Hydrosulfitlösung enthält ca. 0.6 g wasserfreies Natriumhydrosulfit pro Liter. Man löst 0.4 g des Salzes unter Stickstoff in 20 ccm 55-prozentiger Natronlauge und bringt die Lösung in eine der Bürette oben vorgeschaltete tabulierte Saugflasche, die einen halben Liter Wasser enthält. Die Lösung wird durch Stickstoff in die Bürette gedrückt und bleibt ständig unter schwachem Stickstoffdruck. Bei jeder Nachfüllung muß der Titer neu bestimmt werden. Man läßt das Hydrosulfit in die auf etwa 60° vorerwärmte Methylenblau-Lösung bis zur Entfärbung einlaufen unter ständigem Durchleiten von Stickstoff; das Titerverhältnis gegenüber $\frac{1}{300}$ -Methylenblau-Lösung ist bei dieser Bereitungsweise meist etwa gleich 1.

Mit dieser Methode läßt sich die Änderung des Reduktionsvermögens der Milch leicht titrimetrisch bestimmen, und man kann im Gange von Versuchen, die genau unter den seither angewandten Bedingungen angestellt sind, die Abnahme der Methylenblau-Zahl, d. h. den Abfall der Reduktionswirkung, mit ausreichender Genauigkeit feststellen¹⁾.

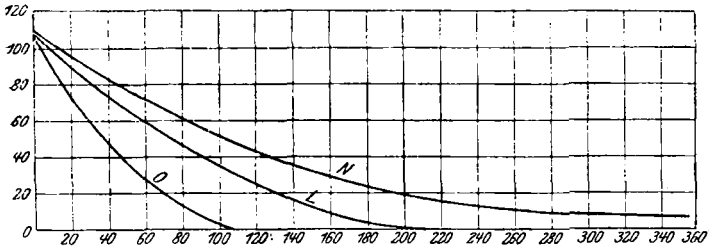
Die nachstehenden Versuche geben die gewonnenen Resultate wieder.

Der erste Versuch ging gleichzeitig unter Stickstoff, Luft und Sauerstoff, beim zweiten und dritten wurden nur die Wirkungen des Stickstoffs (d. h. des Aldehyds allein) und des Sauerstoffs einander gegenübergestellt. Die erste Vertikalreihe enthält die Methylenblau-Zahlen der nicht geschädigten Milch. Bei Versuch I wurden erst relativ spät die ersten Proben entnommen.

		Zeit in Minuten:										
		0	20	50	70	90	100	160	190	220	340	460
Versuch I	N . . .	123	—	—	—	—	68	39	28	—	14	9
	Luft . .	123	—	—	—	—	48	26	14	—	3	0
	O . . .	123	—	—	—	—	6	0	0	0	0	0
» II	N . . .	103	100	83	67	53	50	28	22	17	12	—
	O . . .	103	72	40	12	4	2	0	0	0	0	0
» III	N . . .	127	119	100	88	—	70	41	—	28	18	14
	O . . .	127	80	—	18	—	4	0	—	—	—	—

¹⁾ Bei den entnommenen Proben wurde mit der Abnahme des Reduktionsvermögens gleichmäßig auch das Quantum der zugesetzten Farbstofflösung vermindert, so daß vor der Titration noch 1—2 ccm davon unverbraucht waren.

Die nachstehende Kurve gibt unter Benutzung der Durchschnittswerte den ungefähren Abfall der Methylenblau-Zahl bei der Aldehydkonzentration 0.1 und der Temperatur 60° an.



Beim Vergleich mit dem Verlauf der Mutase- und Oxydase-Reaktion, der durch die Kurve auf S. 2101 veranschaulicht wird, fällt sofort der gleichgerichtete Gang in den einzelnen Gasen auf. Dort drückt sich in der Schnelligkeit, mit der die Annäherung an die Abszissen-Parallele erreicht wird, die Intensität der Schädigung aus. Hier haben wir, abgesehen von geringfügigen Abweichungen, im Prinzip für die einzelnen Reaktionssysteme die gleichen Verhältnisse beim Niedergang der Dehydrasewirkung im Dienste der Methylenblau-Reduktion. Diese Reaktion ist weit empfindlicher und quantitativ viel genauer zu behandeln als die beiden andren, im Umsatz weit hinter ihr stehenden Prozesse. Milch von der Methylenblau-Zahl 5 ist noch sehr deutlich durch die Entfärbung des Blaus als aktiv zu erkennen, für die andren Dehydrase-Reaktionen liefert sie, da ihr Wirkungswert ja auf weniger als ein Zwanzigstel des anfänglichen gesunken ist, innerhalb der Versuchszeit Salicylsäuremengen, die schon in den Bezirk der Versuchsfehler hinein fallen. Daher kommt es, daß der spätere Verlauf der Abschwächung sich in dieser zweiten Methode viel feiner ausprägt, als dies oben möglich war.

Betrachtungen und Versuche über die Kinetik der Dehydrase-Wirkung.

Der Einfluß von Konzentrationsänderungen

Es ist im Vorstehenden gezeigt worden, daß die Kinetik der Dehydrasewirkung scheinbar mit dem Massenwirkungsgesetz nicht im Einklang steht. Die Ursachen hierfür liegen in der großen Instabilität des Ferments; die Umsatzkurve beschreibt gleichzeitig den Verlauf der Fermentzerstörung. Vergleichen wir nun den Gang der Mutase- und Oxydasereaktion bei Gegenwart verschiedener Aldehydmengen, so muß offenbar das Massenwirkungsgesetz Gültigkeit haben, d. h. die gebildete Säure sollte der Konzentration des Aldehyds direkt pro-

portional sein; bei Verdoppelung der Konzentration sollte doppelt so viel Säure entstehen wie bei einfacher usw. Dies wird aber nur für relativ kleine Konzentrationen gelten, von einer gewissen Stufe an wird der sicherlich sehr geringen Fermentmenge das reagierende Substrat in so großem Überschuß zur Verfügung stehen, daß seine Konzentration faktisch gleich unendlich geworden ist. Von da ab wird eine Konzentrationssteigerung ohne jeden Effekt auf den Umsatz sein ¹⁾).

Versucht man sich eine Vorstellung von den reaktionskinetischen Verhältnissen der hier behandelten Fermentreaktionen zu machen, so liegt etwa die folgende, die sich mit allen gemachten Beobachtungen deckt, am nächsten.

1. Der Aldehyd ist in der Lösung der Hauptmenge nach als echter Aldehyd, in einem geringen Betrag als Hydrat enthalten. Die beiden Formen stehen im Gleichgewicht zu einander.

2. Das in der Milch verteilte Dehydraseferment verbindet sich mit dem Aldehydhydrat, dabei werden 2 Wasserstoffatome aktiviert. Diese Vereinigung von Ferment mit Substrat erfolgt mit großer Geschwindigkeit, zum mindesten sicher mit größerer als die nachfolgende Abgabe des Wasserstoffs. Wäre es umgekehrt, so müßten alle Wasserstoffacceptoren bei gleicher Konzentration in gleichen Zeiten gleiche Mengen Aldehyd dehydrieren, was in Wahrheit nicht der Fall ist.

3. Bei den bisher benützten Aldehydkonzentrationen von 0.1—0.15 % betrug die durch Dehydrierung bei der Mutase- und Oxydase-reaktion umgesetzte Menge nur 10—15 % der vorhandenen Substanz. Man wird deshalb annehmen dürfen, daß bei dieser Konzentration das Verhältnis Aldehydhydrat zu Ferment schon ein sehr großes ist, sicherlich so groß, daß der aktivierte Aldehyd bei der großen Geschwindigkeit der Aktivierung den relativ trägen Acceptoren Aldehyd und Sauerstoff immer in der gleichen Konzentration zur Verfügung steht. Von einer weiteren Erhöhung der Aldehydkonzentration ist demnach kein größerer Umsatz zu erwarten, wenigstens nicht insofern, als er sich aus einer Änderung der Geschwindigkeit der Reaktion Ferment + Aldehydhydrat ableiten könnte.

4. Eine Änderung der Konzentration der Wasserstoffacceptoren muß dagegen den Umsatz beeinflussen. So sollten bei gleicher Aldehydmenge unter verschiedenem Sauerstoffdruck verschiedene Mengen Salicylaldehyd dehydrierend oxydiert werden. Ich

¹⁾ Vergl. dazu W. M. Bayliss, Das Wesen der Enzymwirkung. Dresden 1910, S. 45.

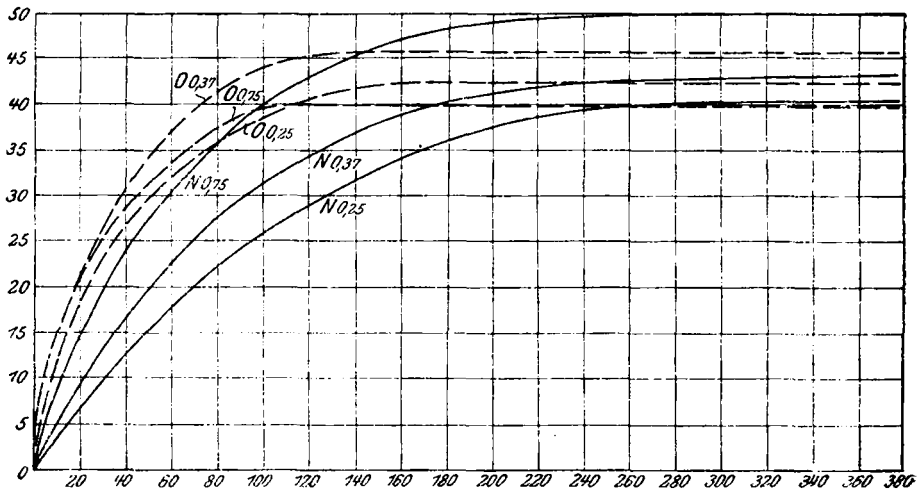
habe diesen Versuch vorläufig noch nicht angestellt. Aber die Änderung der Konzentration des Salicylaldehyds selbst ist ja auch gleichbedeutend mit der Konzentrationsänderung eines Wasserstoffacceptors, da bei der Mutasereaktion die echte Aldehydform den aktivierten Wasserstoff des Hydrats aufnimmt. War demnach nach 3 eine Erhöhung der Aldehydkonzentration für das System Ferment + Aldehydhydrat bedeutungslos, so war von ihr unter dem Gesichtspunkt, daß mit ihr gleichzeitig die Konzentration des Wasserstoffacceptors sich erhöht, eine Steigerung des Aldehydumsatzes zu erwarten.

Die Versuche haben den hier vorgetragenen Betrachtungen recht gegeben. Unter Stickstoff wird bei erhöhter Konzentration des Salicylaldehyds in der Milch erheblich mehr Salicylsäure gebildet. Ausbeute und Aldehydkonzentration stehen dabei freilich nicht in direkter Proportion, weil auch die Schädigung des Fermentes mit der Steigerung der Aldehydkonzentration wächst. Unter Sauerstoff ist eine weit geringere Beeinflussung zu konstatieren. Nach dem unter 3 ausgeführten sollte sie für die Beteiligung des Sauerstoffs beinahe gleich Null sein. Es konnte auch durch Bestimmung der nebenherlaufenden Saligeninausbeuten festgestellt werden, daß wie zu erwarten, die gesteigerte Salicylsäureproduktion bei höherer Aldehydkonzentration fast nur der in stärkerem Maße dabei beteiligten Mutasereaktion zu verdanken ist (vergl. dazu die Saligeninausbeuten auf der folgenden Tabelle).

Die Löslichkeit des Salicylaldehyds setzt für die Temperatur von 60° den vergleichenden Konzentrationsversuchen bei einem Gehalt von etwa 0.6—0.7 % eine Grenze; ich habe die Versuche auf Milchlösungen von 0.1—0.75 % ausgedehnt. Es wurden in parallelen Ansätzen Lösungen (Milch) mit 0.125 solchen von 0.25 und 0.375 % Aldehydgehalt gegenübergestellt.

	Stickstoff						Sauerstoff						
	nach 135 Min.			nach 400 Min.			nach 135 Min.			nach 400 Min.			
0.125 %	Säure	0.018	0.019	0.022	—	0.031	0.034	0.040	0.042	0.037	0.042	0.044	0.039
	Salig.	—	0.024	0.024	—	0.037	0.043	—	—	0.012	—	—	0.010
0.25	Säure	0.034			0.040			0.042			0.045		
	Salig.	0.044			0.054			0.012			0.013		
0.37	Säure	0.033	0.036		0.042	0.049		0.046			0.045		
	Salig.	—	0.048		0.058	0.071		0.023			0.024		
0.75	Säure	0.040 (nach 90 Min.)			0.050 (nach 240 Min.)			0.040 (nach 90 Min.)			0.039 (nach 240 Min.)		
	Salig.	0.050			0.059			0.015			0.018		

Einen rascheren Einblick in die vorliegenden Verhältnisse gewährt die nachstehende Kurventafel.



Die Kurven auf S. 2101 mit der Aldehydkonzentration 0.1 % sind bei der Diskussion mit zu berücksichtigen.

Man sieht sofort die starke Beeinflussung der Mutasereaktion, die geringere der Oxydasereaktion. Bei Gegenwart von Sauerstoff scheint bei einer Aldehydkonzentration von 0.37 % ein Maximum zu existieren, mit 0.75 % geht die Salicylausbeute wieder zurück. Vielleicht potenziert sich die Giftwirkung von Sauerstoff + Aldehyd bei so hoher Aldehydkonzentration. Indes möchte ich mich auf diese Beobachtung nicht festlegen; es sind mit 0.75-prozentiger Milch nur 2 Versuche ausgeführt worden. Überhaupt soll dieses zweite Kurvenbild nur einen ungefähren Einblick in die Verhältnisse gewähren, für eine exakte Durchführung wäre weit mehr Versuchsmaterial nötig als bisher erbracht werden konnte.

Von besonderer Bedeutung ist die Tatsache, daß bei gesteigerter Aldehydkonzentration die Salicylsäureproduktion in Milch unter Stickstoff die unter Sauerstoff überflügelt. Wir ersehen daraus, wie wichtig die Berücksichtigung der Substratkonzentration bei derartigen Fermentarbeiten ist. Denn hätte man, wie dies bisher fast allgemein geschah, die Beteiligung des Sauerstoffs durch den Vergleich der Säureausbeute bei Gegenwart und in Abwesenheit von Sauerstoff zu erkennen versucht, so wäre man bei der zufälligen Anwendung einer geringen Aldehydkonzentration zu dem Eindruck einer begünstigenden Mitbeteiligung, bei größerer zu dem einer deutlichen Giftwirkung gelangt. Selbstverständlich sind bei dieser Frage auch die Reaktionszeiten von allergrößter Wichtigkeit, was sich hier aus den Kurven direkt heraus-

lesen läßt: das Verhältnis der Säureausbeuten unter Sauerstoff und unter Stickstoff nimmt mit der Versuchsdauer ständig ab.

Bei kinetischen Versuchen über die Reduktion von Nitrat zu Nitrit durch Milch und Acetaldehyd findet Bach¹⁾ ebenfalls eine Steigerung des Umsatzes mit steigender Nitratkonzentration. Andererseits beobachtet er auffälligerweise auch einen starken Einfluß der Konzentration des Aldehyds bei dieser äußerst träge verlaufenden Dehydrierungsreaktion.

Die Aldehyd-Konzentration bei der Methylenblau-Reduktion.

Der Grad der Beeinflussung wird nach dem oben Ausgeführten davon abhängen, in welchem Verhältnis die Geschwindigkeit der Wasserstoffaufnahme zu der Geschwindigkeit der Aldehydaktivierung durch das Ferment steht. Diese letztere Reaktion fällt selbstverständlich unter das Gesetz der Massenwirkung; erhöhte Aldehydkonzentration erhöht die Geschwindigkeit der Aktivierung. Aber solange infolge geringer Geschwindigkeit der Bedarf des Acceptors ein kleiner ist, kommt, wie auseinandergesetzt wurde, diese Konzentrationserhöhung im Umsatz nicht zum Ausdruck.

Beim Sauerstoff als Acceptor war wohl ein geringer Einfluß erhöhter Aldehydkonzentration wahrzunehmen. Beim Methylenblau tritt er mit aller Deutlichkeit hervor. Hier findet unter den angewandten Bedingungen die Wasserstoffaufnahme mit etwa achtmal größerer Geschwindigkeit statt als beim Sauerstoff, und es kann demgemäß nicht gleichgültig sein, wie rasch für die Nachlieferung des aktivierten Aldehydhydrates gesorgt wird.

Die Änderung der Aldehydkonzentration, die die Geschwindigkeit dieser »Ersatzreaktion« beeinflusst, wird daher auch die Geschwindigkeit der Methylenblau-Reduktion beeinflussen. Dieser Einfluß muß sich verringern, wenn wir die Geschwindigkeit der Entfärbungsreaktion von vornherein auf ein niedriges Niveau einstellen, d. h. wenn wir den Farbstoff in geringer Konzentration in die Reaktion einführen.

Bei vergleichenden Versuchen, in denen die Zeit bestimmt wurde, in der die jeweils gleiche, aber von Versuch zu Versuch verminderte Menge Farbstoff durch Salicylaldehyd von einfacher und von doppelter Konzentration entfärbt wird, ergab sich das deutliche Ergebnis, daß das Verhältnis der Entfärbungszeiten sich dem Wert 1 nähert. Wir kommen also auch bei der Methylenblau-Reduktion zu einem Reaktionssystem, das gegenüber Änderungen der Aldehydkonzentration innerhalb gewisser Grenzen indifferent ist. Es wird dabei das Minimum des

¹⁾ Bio. Z. 33, 285 [1911].

Umsatzes erreicht, bei dem, unabhängig von der Aldehydkonzentration, von dem Ferment für dauernden, gleichmäßigen Nachschub der aktivierten Aldehydmoleküle gesorgt werden kann.

Versuche. Je 20 ccm Milch wurden der Reihe nach mit 3, 2, 1, 0.5 ccm $\frac{n}{100}$ -Methylenblaulösung gemischt; dann gab man vor jedem Doppelversuch zu der einen Lösung 5 ccm 0.5-prozentiger Salicylaldehydlösung, zur andren 2.5 ccm + 2.5 ccm Wasser. Die Kölbchen wurden hierauf mit Stickstoff gefüllt und gut zugestopft gleichzeitig in den auf 60° geheizten Thermostaten gebracht. Die Zeit der Entfärbung wurde genau abgelesen; sie ist in der nachstehenden Tabelle in Sekunden angegeben.

Methylenblau in ccm	10 ¹⁾		3		2		1		0.5			
mit 5 ccm Aldehyd)	240	255	290	335	210	225	110	120	125	120	100	100
» 2.5 » »)	370	375	415	455	270	315	145	165	145	165	120	125
Verhältnis der Entfärbungszeiten (Mittel)	1.5		1.39		1.35		1.30		1.22			

Zusammenfassung.

1. Es wird eine Methode angegeben, die bei vergleichenden Versuchen eine übereinstimmende Isolierung von Salicylsäure und Saligenin aus Milch möglich macht. Diese beiden Substanzen werden dadurch der quantitativen Behandlung zugänglich. Saligenin kann durch Titration mit Brom scharf bestimmt werden.

2. Mit Hilfe dieser Methoden wird bewiesen, daß drei Aldehydreaktionen, die in ungekochter Milch beschleunigt werden, nämlich die Disproportionierung zu Säure und Alkohol (Mutase-), die Oxydation durch molekularen Sauerstoff (Oxydase-) und die Oxydation durch Methylenblau (Reduktasereaktion), das gleiche Ferment, die Dehydrase, zum Katalysator haben.

3. Der Verlauf dieser drei Reaktionen wird kinetisch studiert; dabei spielen die Fermentschädigungen eine große Rolle. Sie gehen hauptsächlich vom Aldehyd, vom Sauerstoff und vom Methylenblau aus.

4. Es zeigt sich eine vollkommene Übereinstimmung bei der progressiven Inaktivierung des Ferments gegenüber allen drei studierten Funktionen. Das Sinken des Entfärbungsvermögens nimmt den gleichen Weg wie die Abnahme der Aktivität in der Mutase und Oxydasefunktion.

¹⁾ Hier wurde eine 0.8-proz. Aldehydlösung verwendet und zwar 10 und 5 ccm auf 20 ccm Milch.

5. Erhöhung der Aldehydkonzentration steigert den Umsatz unter Stickstoff erheblich, unter Sauerstoff viel weniger. Es wird gezeigt, daß diese Steigerung der Säureausbeute nur auf die gesteigerte Konzentration des Aldehyds in seinem Amt als Wasserstoffacceptor zurückzuführen ist. Dagegen wird die viel rascher verlaufende Hydrierung von Methylenblau innerhalb gewisser Grenzen durch die Konzentration des Aldehyds beeinflußt.

Meinen Privatassistenten, Hrn. Dr. F. J. Weil, der sich im vergangenen Wintersemester mit hervorragendem Geschick und größter Hingebung an dieser Untersuchung beteiligt hat, und Fr. Dr. P. Sachs, die mich seit Beginn dieses Semesters mit ihrer ausgezeichneten Mithilfe unterstützt, danke ich für ihre Beteiligung aufs beste.

Anhang: Erwiderung an die HHrn. Bach und Bredig.

Gegen meine letzte Abhandlung haben zwei Fachgenossen, die HHrn. Bach¹⁾ und Bredig²⁾ in besonderen Artikeln unter dem von mir gewählten Titel Stellung genommen, und ich benutze die Gelegenheit dieser Veröffentlichung, um darauf zu antworten.

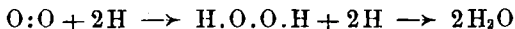
Hr. Bach imputiert mir die Auffassung, als ob ich alle Oxydationsvorgänge, an denen der molekulare Sauerstoff beteiligt ist, für Dehydrierungen halte. Dies ist irrig. Ich habe ja vielmehr in meiner vorletzten Arbeit ausdrücklich angegeben, daß die direkte Autoxydation der Aldehyde auch auf dem Weg der Anlagerung von molekularem Sauerstoff erfolgen kann³⁾. Überhaupt stehe ich für die Autoxydation ungesättigter Systeme, soweit sie bei Wasserausschluß vor sich geht, durchaus auf dem Boden der Engler-Bachschen Theorie. Damit entfällt für mich die Notwendigkeit, auf diejenigen Einwände des Hrn. Bach, die diesem Mißverständnis entspringen, weiter einzugehen.

Einen besonderen Mangel meiner Dehydrierungstheorie sieht Hr. Bach in dem Umstand, daß sie »der Theorie der elektrolytischen Dissoziation und mitunter den modernen Anschauungen über das Wesen der chemischen Reaktionen keine Rechnung trage«, weil sie nämlich die Zersetzung des Wassers durch Zink und namentlich durch die Alkalimetalle nicht verständlich mache. Über diese Reaktionen, die mit den von mir studierten Dehydrierungsvorgängen gar nichts zu tun haben, habe ich mich noch mit keinem Wort geäußert. Es erscheint mir auch für den Wert oder Unwert meiner Vorstellungen, deren Anwendung ich vorerst nur auf die von mir experimentell bearbeiteten Gebiete begrenzt habe, ganz belanglos, ob jene Zersetzungen nach dem von Hrn. Bach bevorzugten Schema verlaufen, oder ob sie vielleicht

¹⁾ B. 46, 3864 [1913]. ²⁾ Ebenda 47, 546 [1914]. ³⁾ B. 45, 2606 [1912].

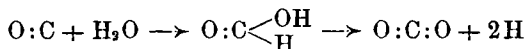
dadurch zustande kommen, daß aus dem Hydrat eines Metallatoms Wasserstoff abgespalten wird.

Was Hr. Bach über die Oxydation des Wasserstoffes in statu nascendi (Punkt 3) vorbringt, ist eine Auffassung vom Mechanismus der Wasserbildung aus den Elementen, die ein vollkommenes Mißverstehen meiner Ableitungen verrät. Ich komme doch gerade aus dem Umstand, daß sich das Sauerstoffmolekül durch aktiven Wasserstoff über Hydroperoxyd zu Wasser hydrieren läßt:



zu der Parallelstellung des Sauerstoffs mit andren Wasserstoffacceptoren.

In der vorletzten Abhandlung über das vorliegende Thema habe ich nachgewiesen, daß Kohlenoxyd durch Palladiumschwarz bei Gegenwart von Wasser in Kohlendioxyd und Wasserstoff umgewandelt wird; dabei wurde gleichzeitig das Auftreten von Ameisensäure festgestellt. Meine Formulierung dieser Reaktion:



ersetzt Bach durch die Theorie, das Kohlenoxyd nehme Hydroxylionen auf, während der Wasserstoff des Wassers vom Metall gebunden werde; die nachgewiesene Ameisensäure betrachtet er als durch Reduktion aus Kohlendioxyd entstanden. Ich halte diese Erklärung für wenig einleuchtend, schon deshalb, weil bei der geringen Kohlensäurekonzentration der Versuchslösung eine auch geringfügige Hydrierung von Kohlendioxyd kaum eintreten wird.

Die zwei weiteren unter 6 und 7 gemachten Einwände erledigen sich wenigstens im Prinzip durch den Inhalt der vorstehenden Mitteilung. Durch sie ist, wie ich glaube, auch die Bachsche Hypothese von einer Perhydridase, bei der mit einem durchaus spekulativen und unwahrscheinlichen Oxyperhydrid, $\begin{array}{c} \text{H} \\ \text{H} \end{array} > \text{O} < \begin{array}{c} \text{H} \\ \text{H} \end{array}$, operiert wird¹⁾, überflüssig geworden.

Der Artikel des Hrn. Bredig enthält keine Einwände, die sich gegen das Gegenständliche meiner Abhandlungen richten. Der Autor macht mir vielmehr den Vorwurf, daß ich in meinen Publikationen über den Mechanismus der Oxydationsvorgänge seine Arbeiten über anorganische Fermente zu wenig berücksichtigt habe. Es ist wenig ersprießlich, über derartige Prioritäts- und Berücksichtigungsfragen zu rechten, und ich möchte am liebsten, so wie es auch Hr. Bredig am Schlusse seiner Ausführungen tut, dem Urteile der Fachgenossen

¹⁾ Oppenheimers Handbuch, wie oben zit., S. 165.

es überlassen, ob ich wirklich so schwere Unterlassungssünden gegenüber Hrn. Bredig begangen habe. Aber die Ausführlichkeit der Bredigschen Reklamation zwingt mich doch zu einer kurzen Abwehr. Hr. Bredig ist nicht damit zufrieden, daß ich bei Besprechung der Schardingerschen Methylenblau-Reaktion die von ihm gemeinsam mit Sommer ausgeführte analoge Reaktion mit Hilfe von Metallsolen als »ersten Einzelfall« anführe. Es handelt sich, soweit die von mir eingehend studierte Aldehydreaktion in Frage steht, in der genannten Arbeit tatsächlich nur um das Beispiel des Formaldehyds, also um einen Einzelfall, und Hr. Bredig wird mir doch einräumen, daß erst die Erkenntnis von der Dehydrierbarkeit der Aldehydhydrate jenem Reduktionsvorgang das Gepräge einer chemisch verständlichen und allgemeinen Reaktion gegeben hat. Ich sehe auch nicht ein, warum ich die erwähnte Arbeit des Hrn. Bredig in meiner nächstfolgenden Abhandlung wieder hätte zitieren sollen (wie Hr. Bredig wünscht), nachdem sie in der Serie der zusammengehörigen Mitteilungen ihren Platz gefunden hatte, und später keinerlei Anlaß mehr bestand, auf sie zurückzugreifen.

Daß ich die im Bredigschen Laboratorium ausgeführte Arbeit von Denham¹⁾ über das Wasserstoffgleichgewicht von Titanisalzen mit Platin als Katalysator in meiner ersten Mitteilung »Hydrierung und Dehydrierung«²⁾ nicht zitiert habe, ist ein Versehen. Ich gebe gerne zu, daß in dieser Arbeit ein wichtiger und namentlich nach der quantitativen Seite hin wertvoller Beitrag zu dem Kapitel von den reversiblen Hydrierungsreaktionen schon vor Beginn meiner eigenen Untersuchungen geliefert war.

**293. Heinrich Wieland und Moritz Offenbächer:
Diphenylstickstoffoxyd, ein neues organisches Radikal mit
vierwertigem Stickstoff.**

[Aus dem Chem. Laborator. der Kgl. Akad. der Wissensch. zu München.]

(Eingegangen am 13. Juni 1914.)

Die weitere Beschäftigung mit dem vor zwei Jahren entdeckten Diphenyl-hydroxylamin³⁾ hat die Synthese einer schon lange angestrebten Verbindung vermittelt. Wir haben Diphenyl-hydroxylamin durch Wegnahme von Wasserstoff von der Hydroxylgruppe in

¹⁾ Ph. Ch. 72, 641 [1910].

²⁾ B. 45, 484 [1912].

³⁾ B. 45, 494 [1912].