

mit einer einzelnen Kausalkette des Wesen des Lebendigen erschöpfend zu erklären. Wir müssen uns begnügen, hier eine Ansicht gefunden zu haben, die den Stoff- und Energiewechsel der Lebewesen in zusammenhängender Form darstellt und die sich, wie ich überzeugt bin, für die Forschung weiterhin fruchtbar erweisen wird. „Was fruchtbar ist, allein ist wahr.“ Diese Vorstellungen, obwohl in ihren letzten Konsequenzen noch teilweise unbestimmt, ruhen gleichwohl auf dem festen Fundament gesicherter chemischer Daten, wie ja dies ganze Gebiet erst durch das Eindringen exakter quantitativer Methoden der Chemie in die Biologie erschlossen werden konnte. So bleibt mir zum Schluß nur übrig, unserer großen und älteren Schwesterwissenschaft, der Chemie, meinen Dank abzustatten, daß sie uns in wachsendem Maße gelehrt hat, das Leben in seinen mannigfachen Erscheinungen zu beherrschen.

### 188. Otto Warburg: Über Eisen, den sauerstoff-übertragenden Bestandteil des Atmungsferments.

[Vortrag, gehalten vor der Deutschen Chemischen Gesellschaft am 29. April 1925.]  
(Eingegangen am 1. Mai 1925.)

Alle mit der Atmung der lebendigen Substanz zusammenhängenden Erscheinungen lassen sich zurückführen auf die Wirkung von zwei Arten von Kräften: auf die Wirkung unspezifischer Oberflächenkräfte und auf die Wirkung spezifischer chemischer Kräfte.

Die unspezifischen Oberflächenkräfte verdichten die Stoffe, die verbrennen, an den Oberflächen der festen Zellbestandteile, und diese Oberflächen, nicht die Zellflüssigkeit, sind der Sitz der Verbrennungsvorgänge. Die Atmung ist eine Reaktion an Oberflächen<sup>1)</sup> und wird als solche durch alle Stoffe gehemmt, die, ohne selbst verbrennbar zu sein, die Brennstoffe von den Oberflächen verdrängen. Dies ist die Erklärung für die Wirkung der chemisch indifferenten Narkotica, die durch Verdrängung von Oberflächen den chemischen Umsatz in der Zelle zum Stillstand bringen.

So leicht es ist, die Existenz und die Wirkung der unspezifischen Oberflächenkräfte in der lebenden Zelle nachzuweisen, so sicher ist es auf der andern Seite, daß diese Kräfte nicht genügen, um eine Reaktion zwischen den organischen Stoffen und dem Sauerstoff herbeizuführen. Eine Reaktion erfolgt erst dann, wenn zu den Oberflächenkräften bestimmte chemische Kräfte hinzukommen. Die adsorbierenden Oberflächen in der Zelle sind nicht homogen, sondern enthalten, in sie eingelagert, eine Substanz, die den Sauerstoff vermöge chemischer Kräfte überträgt. Diese Substanz ist das Atmungsferment. Die Frage nach der chemischen Natur des Atmungsferments<sup>2)</sup> steht heute im Mittelpunkt des Interesses, mit ihr wird sich mein Vortrag beschäftigen.

#### I.

Ich stelle das Ergebnis als Behauptung an die Spitze. Der sauerstoff-übertragende Bestandteil des Atmungsferments ist Eisen. Eisen,

<sup>1)</sup> O. Warburg, *Bio. Z.* **119**, 134 [1921]; *Z. El. Ch.* **28**, 70 [1922].

<sup>2)</sup> Das Atmungsferment läßt sich von der Zelle — in geeigneten Fällen — in ähnlicher Weise abtrennen, wie die Buchnersche Zymase; vergl. O. Warburg, *Pflügers Archiv* **154**, 599 [1913].

in seiner zweiwertigen Form, reagiert mit dem molekularen Sauerstoff, der in der Atmung verschwindet. Das entstandene höherwertige Eisen reagiert mit der organischen Substanz unter Rückbildung zweiwertigen Eisens. So haben wir einen Kreislauf verschiedener Wertigkeitsstufen des Eisens, in dem eine gegebene Menge Eisen, wie bei einer echten Katalyse, beliebig große Mengen organischer Substanz oxydieren kann.

Die Behauptung soll ohne Einschränkung gelten. Niemals reagiert der molekulare Sauerstoff, der in der Atmung verschwindet, mit den organischen Stoffen direkt, sondern immer nur mit dem Eisen, und die Oxydation der organischen Stoffe in der Atmung ist ausschließlich eine solche durch höherwertiges Eisen, eine sehr spezielle Hypothese, die sich gleichwohl sehr allgemein bewährt hat.

Der Gedanke, das Eisen spiele bei den Oxydationsvorgängen in der Zelle eine Rolle, ist nicht neu, sondern mehr oder weniger bestimmt seit den Zeiten Lavoisiers mehrfach aufgetaucht<sup>3)</sup>. Da es aber nicht möglich war, ihn zu begründen, und von den gleichzeitig geäußerten falschen Gedanken als wahr zu unterscheiden, versank er wieder und war für die Wissenschaft wertlos.

## II.

Unsere Behauptung setzt voraus, daß jede lebende Zelle Eisen enthält und daß Leben ohne Eisen unmöglich ist. Wer Zellen kultiviert hat, weiß, daß diese Voraussetzung zutrifft. Jede Nährlösung muß eisenhaltig sein, und das Wachstum der Zellen hört auf, wenn das Eisen der Nährlösungen verbraucht ist. Obwohl schon vor 60 Jahren — von Eusèbe Gris<sup>4)</sup> — erkannt, blieb die Lebensnotwendigkeit des Eisens unerklärt und wurde noch dunkler, als sich zeigte, daß Eisen an dem Aufbau der organischen Zellsubstanz nicht beteiligt sei. Die reinen Proteine, Nucleinsäuren, Chlorophylle sind eisenfrei.

Die Mengen an Eisen, die in der Zelle vorkommen, sind klein. Wir haben den Eisen-Gehalt verschiedener Zellarten bestimmt<sup>5)</sup> und pro Gramm Zell-

<sup>3)</sup> Wenn in der älteren Literatur von der Bedeutung des Eisens für die „Respiration“ gesprochen wird, so ist im allgemeinen der Transport des Sauerstoffs durch das Hämoglobin gemeint, ein Vorgang, der mit dem Thema meines Vortrags nichts zu tun hat. Das Hämoglobin gibt den Sauerstoff, den es in den Lungen aufgenommen hat, in den Gewebs-Capillaren als molekularen Sauerstoff wieder ab, und von hier aus diffundiert der Sauerstoff durch die Gefäßwände zu den Zellen, in denen er veratmet wird. Das Hämoglobin gelangt nicht an die Stätten der Verbrennung, es ist Transportmittel, nicht Katalysator.

Da früher viele Naturforscher glaubten, die Verbrennungen gingen im Blut vor sich, so entstand der Irrtum, das Eisen des Hämoglobins wirke nicht nur als Transportmittel, sondern auch als Katalysator, ein Irrtum, der der Inhalt von Liebig's „Theorie der Respiration“ ist. Am Anfang von Liebig's Theorie (Tierchemie, 1843) steht der Satz: „Die Blutkörperchen enthalten eine Eisenverbindung, kein anderer Bestandteil der lebendigen Körperteile enthält Eisen“.

Richtige Ideen bezüglich des Eisens als Katalysator der Atmung finden sich bei Spitzer, Pflügers Archiv **67**, 615 [1897], und Röhm ann, Bio. Z. **42**, 235 [1912]. Doch ist es Spitzer und Röhm ann noch nicht gelungen, ihre Ideen durch Versuche zu begründen.

<sup>4)</sup> Eusèbe Gris, C. r. (Paris) 1844—1847; vergl. auch Molisch, Die Pflanze in ihren Beziehungen zum Eisen. Jena 1892.

<sup>5)</sup> O. Warburg, Bio. Z. **152**, 479 [1924]. — Muneo Yabusoe, Bio. Z. **157**, 388 [1925].

substanz  $\frac{1}{100}$ — $\frac{1}{10}$  Milligramme Eisen gefunden. Genügen diese kleinen Eisenmengen, um die großen Mengen Sauerstoff, die von der atmenden Zelle verbraucht werden, zu übertragen?

Zur Entscheidung dieser Frage bestimmen wir zunächst die Atmung von Zellen, deren Eisen-Gehalt bekannt ist. Nehmen wir gemäß unserer Behauptung an, daß der veratmete Sauerstoff ausschließlich durch das Eisen übertragen wird, so mißt offenbar der Quotient

$$\frac{\text{Säuerstoffverbrauch}}{\text{Eisengehalt} \times \text{Zeit}}$$

die Reaktionsfähigkeit des Eisens in der Zelle. Wählen wir als Einheiten das Kubikmillimeter Sauerstoff, das Milligramm Eisen und die Stunde, so finden wir für den Quotienten Werte, die je nach der Temperatur und der Zellart zwischen 10000 und 100000 liegen.

Mit diesen Werten wollen wir die Reaktionsfähigkeit des Eisens vergleichen, die wir bei einfachen chemischen Eisen-Katalysen im Reagensglas finden. Als Beispiel wählen wir die Oxydation des Cysteins zu Cystin, die durch Eisensalz katalytisch beschleunigt wird, und messen, wieviel Kubikmillimeter Sauerstoff 1 mg Eisen, einer wäßrigen Cystein-Lösung zugesetzt, pro Stunde überträgt. Wir finden bei 20° 120000 cmm und bei 37° 400000 cmm, also größere Werte als für die Reaktionsfähigkeit des Eisens in der lebenden Zelle.

Diese Rechnung lehrt, daß der Eisen-Gehalt der Zelle mehr als ausreicht, um den Sauerstoff, der in der Atmung verschwindet, zu übertragen. Der Eisen-Gehalt der Zelle ist zwar für den präparativen Chemiker klein, für denjenigen aber, der die katalytischen Wirkungen des Eisens im Auge hat, groß.

### III.

Nachdem wir erfahren haben, daß Eisen lebensnotwendig ist, und daß, mit Hinblick auf die Reaktionsfähigkeit des Eisens, ein Überfluß an Eisen in der Zelle herrscht, fragen wir uns, ob Eisen, der Zellsubstanz zugesetzt, wirklich Sauerstoff überträgt.

Da Eisensalze sehr langsam in lebende Zellen hineindiffundieren, eignen sich für unseren Zweck nur Zellen, deren äußere Grenzschicht man zerstören kann, ohne gleichzeitig ihre Atmung zu vernichten. Eine solche Zelle ist das unbefruchtete Seeigel-Ei, dessen Substanz pro Gramm einige  $\frac{1}{100}$  Milligramme Eisen enthält. Zerstört man die Grenzschicht und setzt Eisensalz hinzu, so steigt der Sauerstoff-Verbrauch. Und zwar steigt der Sauerstoff-Verbrauch in dem Maße, als man den Eisen-Gehalt der Zellsubstanz vermehrt. Es zeigt sich also nicht nur, daß Eisen, der Zellsubstanz zugesetzt, Sauerstoff überträgt, sondern, was viel mehr besagt, daß der Sauerstoff-Verbrauch dem Eisen-Gehalt proportional ist.

Diese Versuche, die ich vor zehn Jahren<sup>6)</sup> — zum Teil gemeinsam mit Otto Meyerhof — ausgeführt habe, beweisen, daß die aufgestellte Behauptung, zum mindesten für den untersuchten besonderen Fall, wahr ist.

Befangen in den damals herrschenden Vorstellungen von der Natur des Atmungsferments, haben wir die geschilderte Beobachtung zufällig gemacht bei dem Versuch, Kohlensäure aus der Eissubstanz mit Weinsäure auszutreiben. Nach Zugabe der Weinsäure entwickelte

<sup>6)</sup> O. Warburg, H. 92, 231 [1914].

sich zunächst Kohlensäure, gleichzeitig aber setzte eine beträchtliche und langanhaltende Sauerstoff-Absorption ein, die nichts anderes war, als eine katalytische Oxydation der Weinsäure durch das Eisen der Zellsubstanz. Denn dieselben Eisenmengen, wie sie in der Zellsubstanz vorhanden waren, als Ferrosalz zu einer reinen Weinsäure-Lösung zugesetzt, erzeugten eine gleich schnelle Sauerstoff-Absorption.

#### IV.

Nimmt man an, daß Eisen allgemein so, wie im Seeigel-Ei wirkt, so ergibt sich die Möglichkeit, eine der merkwürdigsten mit der Atmung zusammenhängenden Erscheinungen zu verstehen, die Tatsache, daß minimale Mengen von Blausäure die Atmung der Zelle zum Verschwinden bringen.

Die Wirkung der Blausäure auf die Atmung ist im vorigen Jahrhundert von Claude Bernard<sup>7)</sup> entdeckt und, ohne den Versuch einer Erklärung, mit der Bemerkung mitgeteilt worden: „Mitscherlich, dem man eines Tages von der Wirkung der Blausäure erzählte, hielt ihre Wirkung für sehr geheimnisvoll und eine Aufklärung ihrer Wirkung für sehr wichtig.“

In der Tat hemmt Blausäure in  $1/1000$  - bis  $1/100000$ -normaler Lösung die Atmung der meisten Zellen. Eine aus unsrer Zeit stammende Angabe<sup>8)</sup>, daß höhere Blausäure-Konzentrationen die Atmung wieder in Gang bringen, war von vornherein unwahrscheinlich und ist unrichtig.

Wenn wir die Wirkung der Blausäure oder irgend eines anderen Stoffes auf die lebendige Substanz verstehen wollen, so ist zunächst zu untersuchen, ob eine spezifische chemische Wirkung oder eine unspezifische Oberflächenwirkung vorliegt. Die meisten zellfremden Stoffe hemmen den chemischen Umsatz in der Zelle, indem sie sich an den Oberflächen ausbreiten, und lassen sich in eine Reihe ordnen, in der die Wirksamkeit mit der Adsorptionskonstante zunimmt. In diese Reihe paßt die Blausäure nicht. Gemäß ihrer kleinen Adsorptionskonstante gehörte sie an den Anfang der Reihe, gemäß ihrer großen Wirkungstärke an das Ende. Blausäure ist rund 10000-mal wirksamer, als sie nach ihrer Adsorptionskonstante sein dürfte<sup>9)</sup>. Es ist daraus zu schließen, daß die Wirkung der Blausäure kein Ausbreitungsphänomen ist, sondern zustandekommt durch eine chemische Reaktion.

Die Mengen an Blausäure, die bei dieser Reaktion von der Zelle gebunden werden, sind, wie man durch Messungen feststellen kann, sehr klein. Da nun eine stöchiometrische Beziehung bestehen muß zwischen der gebundenen Blausäure und dem Stoff, der sie bindet, so folgt aus dem Gesagten, daß die Zelle eine sehr kleine Menge eines Stoffes enthält, der imstande ist, einerseits Sauerstoff zu übertragen, andererseits mit Blausäure zu reagieren. Von allen Stoffen, die als integrierende Bestandteile lebender Zellen bekannt sind, erfüllt diese beiden Bedingungen nur das Eisen. Eisen kann, wie wir gesehen haben, Sauerstoff übertragen, und Eisen besitzt als Schwermetall die

<sup>7)</sup> Claude Bernard, *Les substances toxiques*.

<sup>8)</sup> Ph. Ellinger, *H. 136*, 19 [1924]. Ellinger hat, wie mir Hr. Meyerhof mitteilt, die Absorption von Blausäure-Dämpfen für eine Sauerstoff-Absorption gehalten. Auch die katalytische Wirkung der Lenardschen Phosphore, über die Ellinger berichtet (*H. 123*, 246 [1922]), konnte bei einer Nachprüfung in meinem Laboratorium nicht bestätigt werden.

<sup>9)</sup> Angaben über die Adsorption der Blausäure findet man *Bio. Z. 119*, 134 [1921].

Fähigkeit, mit Blausäure zu reagieren. So liegt der Schluß nahe, daß die Wirkung der Blausäure auf die lebendige Substanz in nichts anderem besteht, als in der Bindung katalytisch wirksamen Eisens zu einer katalytisch unwirksamen Eisen-Blausäure-Verbindung.

Ein zweiter Stoff, der spezifisch-chemisch auf die Atmung wirkt, ist Schwefelwasserstoff. Schwefelwasserstoff hemmt nach Messungen von Erwin Negelein<sup>10)</sup> die Atmung in Konzentrationen von  $\frac{1}{10\,000}$  bis  $\frac{1}{100\,000}$ -normal. Alle Überlegungen, die wir hinsichtlich der Blausäure angestellt haben, gelten auch für diesen Stoff, seine Wirkung erklären wir durch die Bildung von Schwefeleisen.

Ein dritter Stoff, der die Atmung spezifisch-chemisch hemmt, ist die arsenige Säure<sup>11)</sup>, die bekanntlich mit Eisen komplexe Eisenarsenite bildet. Allgemein muß jede Substanz, die mit Eisen reagiert, die Atmung stören, vorausgesetzt, daß sie in die lebende Zelle eindringt und daß ihre Affinität zu Eisen ausreicht, um die natürlichen Bindungen des Eisens zu lösen.

## V.

Alles Bisherige spricht zwar für die Wahrheit der Theorie, gibt uns aber doch noch nicht jenen Grad von Sicherheit, den wir auf diesem an Irrtümern und Enttäuschungen reichen Gebiet verlangen müssen.

Um zu einer Entscheidung zu kommen, habe ich den Weg eingeschlagen, den man in der organischen Chemie zu gehen pflegt. In der organischen Chemie entscheidet über eine Theorie die Synthese, die auf Grund der Theorie ausgeführt wird. Der Synthese entspräche in unserem Fall die künstliche Herstellung atmender Systeme. Gelingt es, mit Hilfe von Eisen Systeme aufzubauen, die insofern die Eigenschaften der lebendigen Substanz zeigen, daß in ihnen organische Stoffe verbrennen und daß diese Verbrennung durch Blausäure spezifisch gehemmt wird?

Die näheren Bedingungen für derartige Versuche sind durch die Bedingungen vorgeschrieben, unter denen das Leben sich vollzieht, so die niedrige Temperatur und die neutrale Reaktion. Es ist kaum nötig hervorzuheben, daß das Oxydationsmittel molekularer Sauerstoff sein muß, nicht etwa aktivierter Sauerstoff sein darf, wie Ozon, Wasserstoffperoxyd oder Chinon. Aktivierter Sauerstoff in geeigneter Form greift alle organischen Moleküle an, und was zur Diskussion steht, ist ja gerade, ob molekularer Sauerstoff + Eisen dieselben Wirkungen hervorruft wie aktivierter Sauerstoff.

Wir beschränken uns also streng auf den molekularen Sauerstoff und untersuchen zunächst, unter welchen Bedingungen die Reaktion zwischen molekularem Sauerstoff und zweiwertigem Eisen — nach der Theorie die Primärreaktion der Atmung — eintritt. Dabei zeigt sich, daß freie Ferro-Ionen praktisch mit molekularem Sauerstoff nicht reagieren und ihn folglich auch nicht übertragen können. Schnell mit molekularem Sauerstoff reagieren gewisse gelöste komplexe Ferrosalze, wie Ferropyrrophosphat und Ferrocitrat, sowie gewisse feste Eisenverbindungen, wie Ferrohydroxyd.

Fügt man aber zu Ferroverbindungen, die schnell mit Sauerstoff reagieren, organische Stoffe, so erfolgt im allgemeinen<sup>12)</sup> keine Übertragung von Sauerstoff.

<sup>10)</sup> Unveröffentlichte Versuche von Erwin Negelein. <sup>11)</sup> H. 70, 433 [1910].

<sup>12)</sup> Vergl. jedoch H. A. Spöehr, Am. Soc. 46, 1494 [1924].

Die Absorption des Sauerstoffs in derartigen Gemischen ist im allgemeinen beendigt, wenn das Eisen oxydiert ist. Falls es also überhaupt möglich ist, mit Hilfe von Eisen Atmung künstlich hervorzurufen, so muß das Eisen in ganz besondere und bisher unbekannte Bindungen übergeführt werden.

## VI.

Erhitzt man krystallisiertes Hämin<sup>13)</sup>, eine Pyrrol-Eisen-Verbindung, auf Rotglut, so bleibt eine schwarz gefärbte Substanz zurück, die nach Extraktion mit heißer Salzsäure neben Kohlenstoff Stickstoff und Eisen enthält. Diese Substanz — die „Hämin-Kohle“ — wirkt auf Aminosäuren als Oxydations-Katalysator. Trägt man sie in wäßrige Lösungen von Aminosäuren ein und schüttelt mit molekularem Sauerstoff bei Körpertemperatur, so wird Sauerstoff absorbiert und auf die Aminosäuren übertragen. Aus Leucin entsteht hierbei Ammoniak, Kohlensäure und Valeraldehyd, aus Cystin Ammoniak, Kohlensäure und Schwefelsäure neben noch unbekanntem Produkten unvollständiger Verbrennung. Wir haben also eine Reaktion zwischen Aminosäuren und molekularem Sauerstoff vor uns, bei der, wie bei der Eiweiß-Verbrennung in lebenden Zellen, Ammoniak, Kohlensäure und Schwefelsäure erscheinen.

Fragen wir, welcher Bestandteil des Katalysators hierbei wirksam ist, so tritt im Prinzip dieselbe Schwierigkeit auf, wie bei Versuchen mit lebenden Zellen. Gegeben ist ein Gemisch verschiedenartiger Substanzen, zu entscheiden ist, welcher Bestandteil des Gemisches die beobachtete Wirkung hervorbringt. Doch haben wir hier den großen Vorteil, daß wir das katalytisch wirksame Substanzgemisch künstlich herstellen können. Um unsere Frage zu entscheiden, haben wir nur nötig, verschiedene Stoffe zu glühen und die katalytische Wirksamkeit der entstehenden Kohlen mit ihrer chemischen Zusammensetzung zu vergleichen.

Bei derartigen Versuchen zeigte sich, daß Kohlen von der katalytischen Wirksamkeit der Hämin-Kohle immer dann entstehen, wenn zwei Bedingungen erfüllt sind: wenn das Ausgangsmaterial nicht flüchtigen Stickstoff und wenn es außerdem Eisen enthält. Reinigt man geeignete stickstoffhaltige Substanzen, so daß sie nur noch wenig Eisen enthalten und glüht sie, so entstehen schwach wirksame Kohlen. Tränkt man diese Kohlen mit Eisensalz und glüht, so werden sie aktiviert und erlangen die katalytische Wirksamkeit der Hämin-Köhle. Je eisenreicher, um so wirksamer sind die stickstoffhaltigen Kohlen, bis bei einem Eisen-Gehalt von einigen Zehntel Milligrammen pro Gramm Kohle das Maximum der Wirkung erreicht ist.

Keine Aktivierung tritt ein, wenn man stickstoffhaltige Kohlen mit anderen Metallen oder stickstoff-freie Kohlen mit Eisen glüht. Die katalytisch wirksame Substanz der Hämin-Kohle ist also Eisen, aber nicht Eisen in beliebiger Form, sondern Eisen gebunden an Stickstoff.

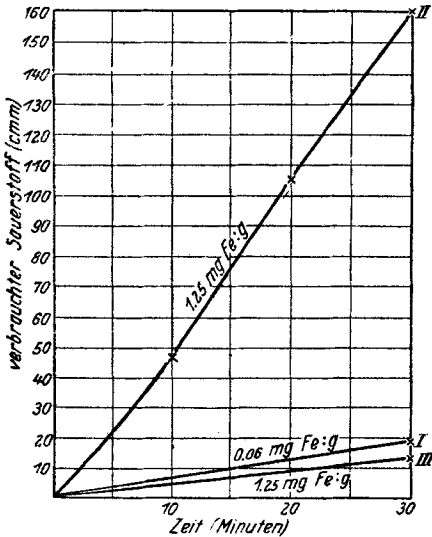
## VII.

Die katalytische Wirkung des an Stickstoff gebundenen Eisens wird, wie die Atmung der lebenden Zelle, durch Blausäure spezifisch gehemmt.  $\frac{1}{10\,000}$ -n. Blausäure setzt die Wirksamkeit der Hämin-Kohle und aller übrigen Eisen-Stickstoff-Verbindungen, die wir geprüft haben, merklich herab,  $\frac{1}{1000}$ -n. Blausäure bringt die katalytische Wirksamkeit der Hämin-Kohle

<sup>13)</sup> O. Warburg und W. Brefeld, Bio. Z. 145, 461 [1924].

praktisch zum Verschwinden. Ich stehe nicht an, in diesem Ergebnis einen Beweis für die Wahrheit der Theorie zu sehen.

Eine Abbildung mag diese entscheidenden Versuche veranschaulichen. Die Abszissen bedeuten die Versuchszeiten, die Ordinaten die übertragenen Sauerstoff-Mengen. Die Aminosäure, auf die der Sauerstoff in unserem Beispiel übertragen wird, ist Leucin, die Kohlen, die den Sauerstoff übertragen, sind aus einem stickstoffreichen Anilin-Farbstoff, dem Bismarckbraun, hergestellt.



Je 20 mg Kohle + 10 ccm Lösung.

I: Kohle nicht aktiviert, in reiner  $n/20$ -Leucin-Lösung. II: Kohle, mit Eisen aktiviert, in reiner  $n/20$ -Leucin-Lösung. III: Kohle, mit Eisen aktiviert, in  $n/20$ -Leucin-,  $n/1000$ -Blausäure-Lösung.

Kurve I zeigt die Sauerstoff-Übertragung durch eisen-arme Kohle, Kurve II die Sauerstoff-Übertragung durch dieselbe Kohle, nachdem ihr Eisen-Gehalt erhöht worden ist, Kurve III die Sauerstoff-Übertragung durch die eisenreiche Kohle in einer  $1/1000$ -n. Blausäure-Lösung. Wie man sieht, steigt die Wirksamkeit der Kohle, wenn ihr Eisen-Gehalt steigt, und verschwindet die ganze Wirkung des Eisens unter dem Einfluß der Blausäure.

### VIII.

Was die Reaktionsfähigkeit des Eisens in seiner Bindung an Stickstoff anbetrifft, so berechnen wir sie, indem wir die Zunahme des

Sauerstoff-Verbrauchs, die bei Zusatz von Eisen auftritt, durch die zugesetzte Eisenmenge und die Zeit dividieren. In dem durch die Figur wiedergegebenen Beispiel finden wir in den früher benutzten Einheiten einen Wert von 12000. Dies ist ungefähr die Reaktionsfähigkeit des Eisens in der Substanz des unbefruchteten Seeigel-Eies. Die Reaktionsfähigkeit des Eisens in seiner Bindung an Stickstoff ist also von derselben Größenordnung, wie die Reaktionsfähigkeit des Eisens in der lebenden Zelle.

### IX.

Von dem großen Heer der organischen Stoffe greift das Eisen der Hämin-Kohle nur eine engbegrenzte Zahl mit merklicher Geschwindigkeit an, von den Hauptbrennstoffen der Zelle weder Zucker, noch Fettsäuren, sondern nur Aminosäuren. Die Wirkung ist also bemerkenswert spezifisch. Ähnlich spezifisch wirkt das Metall in einem zweiten nunmehr zu besprechenden System, in dem nur Kohlenhydrat angegriffen wird.

Löst man Fructose in neutralem Natriumphosphat<sup>14)</sup> und leitet durch die Lösung bei Körpertemperatur Sauerstoff, so wird Sauerstoff von dem Zucker absorbiert, um so schneller, je höher die Konzentration

<sup>14)</sup> O. Warburg und M. Yabusoe, Bio. Z. 146, 380 [1924].

an Phosphat. Derselbe Zucker, in anderen Salzen aufgelöst, absorbiert keinen Sauerstoff. Es handelt sich also um spezifische Wirkung des Phosphats, unter dessen Einfluß, wie es zunächst scheint, Fructose autoxydabel wird.

Ähnlich wie Fructose verhalten sich nach Messungen von Franz Wind<sup>15)</sup> Sorbose, Dioxy-aceton und Glycerinaldehyd mit dem Unterschied, daß die beiden 3-Kohlenstoff-Zucker 30-mal schneller angegriffen werden als Fructose. Die Geschwindigkeit der Oxydation ist dann so groß, daß nach etwa 90 Min. die Hälfte des anfänglich vorhandenen Zuckers oxydativ zerstört ist.

Als Endprodukt der Reaktion tritt Kohlensäure auf und zwar pro Molekül verbrauchten Sauerstoffs — je nach den Bedingungen und dem Zucker —  $\frac{1}{3}$  bis fast  $\frac{1}{2}$  Molekül Kohlensäure. Die Oxydation ist also nicht vollständig, wie in der lebenden Zelle, liefert aber doch in großen Mengen das physiologische Endprodukt der Kohlenhydrat-Verbrennung.

Meyerhof<sup>16)</sup> hat gefunden, daß auch diese Oxydation durch kleine Konzentrationen von Blausäure gehemmt wird, weiterhin, daß kleine Mengen Schwermetall die Oxydation beschleunigen und daß die Wirkung des zugesetzten Metalls durch Blausäure aufgehoben wird. Wir können also auch hier organische Substanz mit Hilfe von Eisen verbrennen und auch hier die katalytische Wirkung des Eisens durch Blausäure zum Verschwinden bringen, in einem System, das ausschließlich aus Stoffen aufgebaut ist, die in der lebenden Zelle vorkommen.

## X.

Wenn wir finden, daß Blausäure die Oxydation in den Phosphat-Lösungen hemmt, und daß Metall die Oxydation beschleunigt, so liegt der Schluß nahe, daß auch dann, wenn kein Metall zugesetzt wurde, die Oxydation eine Metall-Katalyse ist. Denn alle Laboratoriumspräparate und Lösungen enthalten kleine Mengen Metall als Verunreinigung. Scheut man die Mühe nicht, die Systeme von den verunreinigenden Metallspuren weitgehend zu befreien, so hat sich bisher immer gezeigt, daß da, wo Blausäure eine Oxydation antikatalytisch hemmt, eine Metall-Katalyse vorliegt.

Der physiologisch wichtigste Fall ist die sog. Autoxydation des Cysteins, einer schwefel-haltigen Aminosäure, von der man bisher annahm, daß sie direkt mit dem molekularen Sauerstoff unter Bildung von Disulfid reagiere. Ein Derivat des Cysteins ist die von Hopkins<sup>17)</sup> in der lebendigen Substanz entdeckte Cystein-Glutaminsäure, die wie das Cystein, bei Berührung mit Luft in das Disulfid übergeht.

Uns interessiert hier im wesentlichen die Tatsache, daß die Oxydation dieser schwefel-haltigen Körper an der Luft durch Blausäure gehemmt wird. Die ersten Versuche über die Wirkung der Blausäure auf die Oxydation der Sulfhydrylgruppe stammen von Mathews und Walker<sup>18)</sup> und sind mit Cystein ausgeführt worden. Betrachten wir diese Versuche näher, so stoßen wir auf die Schwierigkeit, daß 1 Mol. Blausäure die Oxydation von 1000 Cystein-Molekülen und mehr hemmen kann. Ob man nun annimmt,

<sup>15)</sup> F. Wind, *Bio. Z.* **159**, 58 [1925].

<sup>16)</sup> O. Meyerhof und Matsuoka, *Bio. Z.* **150**, 1 [1924].

<sup>17)</sup> F. G. Hopkins, *Biochem. Journ.* **15**, 286 [1921].

<sup>18)</sup> Mathews und Walker, *Journ. Biol. Chem.* **6**, 21 und 29 [1906].



die Blausäure wirke auf das Cystein oder den Sauerstoff oder auf irgend ein unbekanntes Reaktionsprodukt beider, immer könnte eine kleine Blausäure-Menge die Geschwindigkeit der Oxydation nur um einen kleinen Bruchteil hemmen, während der Versuch lehrt, daß Blausäure die Oxydation fast vollständig hemmt.

Die hier vorliegende Schwierigkeit verschwindet, wenn wir annehmen, daß eine direkte Reaktion zwischen Cystein und Sauerstoff gar nicht vorliegt, sondern eine Sauerstoff-Übertragung durch Metalle, die nach der bisherigen Arbeitsweise der Autoren in den Cystein-Lösungen immer als Verunreinigung vorhanden gewesen sein mußten. Zur Prüfung dieser Annahme haben wir<sup>19)</sup> Cystein-Chlorhydrat in Quarzgefäßen umkrystallisiert und haben das zur Neutralisation erforderliche Alkali durch Destillation von Ammoniak in Quarzgefäßen gewonnen. Dabei zeigte sich, daß mit zunehmendem Reinheitsgrad der Cystein-Lösungen die Oxydationsgeschwindigkeit kleiner und kleiner wurde. Während die Präparate von Mathews und Walker beim Schütteln mit Luft nach wenigen Stunden zur Hälfte oxydiert waren, betrug die Zeit halben Umsatzes in unseren besten Versuchen 14 Tage. Setzen wir diesen Lösungen Eisen zu, so entstanden wieder die schnell oxydablen Lösungen von Mathews und Walker.

Die hier wirksamen Eisenmengen sind außerordentlich klein, es sind wirklich nur Spuren. Einige  $\frac{1}{100000}$  mg Eisen, zu 10 ccm einer gereinigten Cystein-Lösung zugesetzt, erzeugen schon beträchtliche und gut meßbare Oxydationsbeschleunigungen, Eisenmengen, die mit den gebräuchlichen Reagenzien der analytischen Chemie nicht mehr nachweisbar sind. Dies ist der Grund, daß man die Beteiligung der Metalle an dem Vorgang bisher übersah.

Ich füge hinzu, daß unsere Versuche von Harrison<sup>20)</sup> in Hopkins Laboratorium wiederholt und auf die Cystein-Glutaminsäure ausgedehnt worden sind. Nach Harrison verhält sich die Cystein-Glutaminsäure genau so wie das Cystein. Die Sulphydrylgruppe in ihrer physiologisch wichtigen Bindung ist also entweder gar nicht autoxydabel oder in einem für uns belanglosen Maße. Die unentscheidbare Frage, ob hier ein Rest von Autoxydation bleibt oder nicht, tritt ganz zurück gegen die nunmehr feststehende Tatsache, daß der durch Blausäure hemmbare Anteil der Oxydation eine Sauerstoff-Übertragung durch Metall ist.

## XI.

Ich schließe die Aufzählung der von uns untersuchten Fälle von Blausäure-Wirkung mit dem einfachsten, der in der Geschichte des Blausäure-Problems eine Rolle spielt und der durch seine Einfachheit überzeugt.

Wie Millon<sup>21)</sup> im Jahre 1844 fand, verhindern minimale Mengen von Blausäure die oxydierende Wirkung der Jodsäure auf organische Stoffe. Geppert<sup>22)</sup>, der sich nach Claude Bernard mit der Blausäure beschäftigte, führt am Schluß seiner Arbeit die Millonsche Beobachtung an, mit dem Hinweis, daß die Wirkung der Blausäure auf die lebendige

<sup>19)</sup> O. Warburg und S. Sakuma, Pflügers Archiv **200**, 203 [1923], und S. Sakuma, Bio. Z. **142**, 68 [1923].

<sup>20)</sup> D. C. Harrison, Biochem. Journ. **18**, 1009 [1924].

<sup>21)</sup> M. E. Millon, C. r. (Paris) **19**, 270 [1844].

<sup>22)</sup> J. Geppert, Über das Wesen der Blausäure-Wirkung, Berlin 1889.

Substanz zwar unverständlich sei, daß aber doch bemerkenswerte chemische Analogien vorlägen.

Shigeru Toda<sup>23)</sup> hat den Fall in Dahlem näher untersucht und zunächst festgestellt, daß die Angaben von Millon zutreffen. Jodsäure und Oxalsäure, in Wasser gelöst, reagieren bei Zimmertemperatur miteinander unter Bildung von Kohlensäure und Jod. Minimale Mengen von Blausäure hemmen die Reaktion. Konzentrierte Lösungen von Jodsäure und Oxalsäure, die pro Liter  $\frac{1}{1000}$  Mol. Blausäure enthalten, bleiben wochenlang reaktionslos.

Zur Erklärung der Erscheinung haben wir wiederum angenommen, daß eine Metall-Katalyse vorliegt und haben die Jodsäure und die Oxalsäure nach denselben Prinzipien gereinigt wie das Cystein. In der Tat wird die Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Jodsäure und Oxalsäure umso kleiner, je reiner die Präparate sind, und in der Tat stellt Eisen, in minimalen Mengen den reinen Lösungen zugesetzt, die Reaktionsgeschwindigkeit der unge reinigten Lösungen wieder her. Blausäure bringt die Wirkung des zugesetzten Eisens zum Verschwinden, ein Beweis, daß auch hier die Wirkung der Blausäure nichts anderes ist, als eine Wirkung auf Schwermetall.

## XII.

Welcher Art die Verbindungen zwischen Blausäure und Eisen sind, läßt sich allgemein nicht beantworten. Es mag Fälle geben, in denen sich Ferro- oder Ferricyanwasserstoffsäure bildet. Es ist sicher, daß sich diese festen Verbindungen in der lebenden Zelle nicht bilden, da die Wirkung der Blausäure auf die lebendige Substanz reversibel ist. Kurzes Waschen blausäure-haltiger Zellen mit blausäure-freien Lösungen genügt, um die Blausäure aus ihren Bindungen zu lösen und damit die vorher gehemmte Atmung wieder in Gang zu bringen.

Da man nun bei der Wirkung der Blausäure auf das Eisen zunächst an die bekannten komplexen Säuren denkt, diese aber, aus dem erwähnten Grunde, sich in der lebenden Substanz nicht bilden können, so liegt hier offenbar noch ein Punkt vor, der der Stütze durch Experimente bedarf. Die Existenz lockerer Verbindungen zwischen Eisen und Blausäure ist noch zu beweisen.

Hierzu eignet sich das System Jodsäure-Oxalsäure-Eisen. Fügt man zu einer eisen-haltigen Jodsäure-Oxalsäure-Lösung soviel Blausäure hinzu, daß die Reaktion vollständig gehemmt ist, und leitet dann einen blausäure-freien Luftstrom durch die Lösung, so ist nach kurzer Zeit die gesamte Blausäure ausgetrieben und die vorher gehemmte Reaktion wieder in Gang gebracht. Damit ist auch die Reversibilität der Blausäure-Wirkung, wie wir sie in der lebendigen Substanz beobachten, im Reagensglasversuch demonstriert und die Existenz lockerer Verbindungen zwischen Eisen und Blausäure bewiesen.

## XIII.

Überblicken wir das Vorgetragene, so glaube ich, daß derjenige Grad von Sicherheit erreicht ist, den wir verlangt haben, und der erreichbar ist. Eisen ist der sauerstoff-übertragende Bestandteil des Atmungsferments, das Atmungsferment ist die Summe aller katalytisch wirksamen Eisenverbindungen, die in der Zelle vorkommen.

<sup>23)</sup> Unveröffentlichte Versuche von Shigeru Toda.

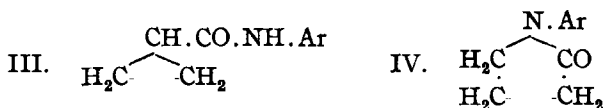
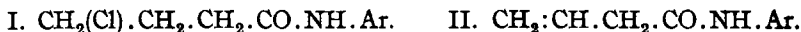
Zugunsten dieses Schlusses möchte ich noch anführen, daß es heute keine andere Möglichkeit gibt, sich von der Wirkung des Atmungsfermentes Rechenschaft zu geben. Es existiert keine andere Vermutung, kein Versuch einer Theorie in bezug auf die chemische Natur des Atmungsferments. Lehnt man also den Schluß, den wir gezogen haben, ab, so verzichtet man darauf, ein großes Erscheinungsgebiet zu verstehen. Niemand kann heute die Lebensnotwendigkeit des Eisens, die Wirkungsweise der Blausäure anders erklären, als wir es getan haben und niemand ist imstande, mit Hilfe der in der lebendigen Substanz vorkommenden Stoffe die Erscheinungen der Atmung künstlich hervorzurufen, es sei denn mit Hilfe von Eisen<sup>24)</sup>.

### 189. P. Lipp und F. Caspers: Eine Synthese von *N*-Aryl- $\alpha$ -pyrrolidonen.

[Aus d. Organ.-chem. Laborat. d. Techn. Hochschule Aachen<sup>1)</sup>.]

(Eingegangen am 28. März 1925.)

Im Anschluß an Versuche über die Existenzbedingungen des Cyclopropanols, über die wir später im Zusammenhang zu berichten hoffen, untersuchten wir das  $\gamma$ -Chlor-*n*-buttersäure-anilid (I) und -*p*-toluidid auf sein Verhalten gegenüber schmelzendem Alkali. Bei energischem Chlorwasserstoff-Entzug war dabei die Möglichkeit zur Bildung eines Vinylessigsäure- (II), eines Cyclopropan- (III) oder eines Pyrrolidon-Derivates (IV) gegeben:



Der bekannte Ringschluß des  $\gamma$ -Chlor-*n*-buttersäure-nitrils zum Trimethylen-Derivat nach Henry<sup>2)</sup> zeigt schon, daß die Neigung zur Ausbildung einer Äthylenbindung (Fall II) sehr gering ist, so daß nur noch Fall III und IV in Frage kamen. Es war zu erwarten, daß die Konkurrenz dieser beiden Ringbildungs-Möglichkeiten zugunsten des fünf-gliedrigen Heterorings ausfallen würde, wie es das Experiment auch bestätigt hat. Das

<sup>24)</sup> Zur Methodik der Versuche, über die in diesem Vortrag berichtet wurde, ist Folgendes zu bemerken: die ersten Versuche (H. 57, 1 [1908], 66, 305 [1910]) sind durch Titration des gelösten Sauerstoffs nach Winkler oder Schützenberger ausgeführt worden. Später bin ich zur gasanalytischen Methodik übergegangen und vor allem zur manometrischen Messung der Atmung. Als Manometer benutze ich im allgemeinen Barcroftsche Wasser-Manometer. Das Prinzip meiner manometrischen Methode findet man in Bio. Z. 152, 51 [1924]. Diese Methode erlaubt nicht nur, den Sauerstoff-Verbrauch und die Atmungs-Kohlensäure zu messen, sondern auch die Gärung von Zellen neben ihrer Atmung in ein und demselben Versuch zu bestimmen.

<sup>1)</sup> vergl. auch Fritz Caspers, Dissertation, Techn. Hochschule Aachen 1923. Für die experimentelle Bearbeitung standen uns Mittel der „Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft“ zur Verfügung, der wir für ihr wiederholtes Entgegenkommen aufrichtig danken.

<sup>2)</sup> vergl. z. B. R. 18, 228 [1899].