

2-Jod·3.5-diacetyldiamino-4-oxy-phenyl-1-arsinsäure (IV).

Diese Säure wird ganz ebenso wie die voranstehende aus der entsprechenden mercurierten Arsinsäure durch Behandeln mit einer Jod-Jodkalium-Lösung erhalten. Die Eigenschaften und ihr Verhalten gleichen der vorhergehend beschriebenen Jod-arsinsäure. Auch sie läßt sich durch Reduktion mit Hydrosulfit bei 40–50° in die entsprechende Arseno-Verbindung (VI) überführen; diese ist nur in Ätzalkalien löslich.

0.1507 g Subst. (im Vakuum über P_2O_5 getrocknet): 0.0778 g AgJ. — 0.2511 g Subst.: 0.0841 g $Mg_2As_2O_7$.

$C_{10}H_{12}O_6N_2JAs$. Ber. J 27.72, As 16.38. Gef. J 27.91, As 16.17.

35. S. Hennichs:

Aktivität und Eisen-Gehalt hochaktiver Katalase-Präparate.

[Aus d. Chem. Laborat. d. Universität Stockholm.]

(Eingegangen am 21. Dezember 1925.)

Wenn auch die Rolle, welche die Katalase in lebenden Tier- und Pflanzenzellen spielt, ihrer Art nach noch nicht aufgeklärt ist, so steht es doch außer Zweifel, daß dieses Enzym im Organismus einen wesentlichen Teil des Oxydo-Reduktions-Systemes ausmacht.

„Wir glauben“ — schreibt Wieland¹⁾ — „daß sich schon jetzt eine weitere, sehr verbreitete Enzym-Wirkung auch jenem Reaktionssystem eingliedern läßt, nämlich die katalytische Zersetzung des Hydroperoxyds in Wasser und Sauerstoff, die durch die sog. Katalasen ungemein stark beschleunigt wird.“ Die von Loew²⁾ zuerst geäußerte Auffassung über die Wirkung der Katalase in Zellen hat Wieland in seinen ausgezeichneten Studien über Oxydationsprozesse und deren Katalysatoren allseitig beleuchtet. Nach Wielands Theorie ist das Hydroperoxyd das erste Produkt der Hydrierung des molekularen Sauerstoffs, und es muß auch während der Atmung im Organismus in erster Phase Hydroperoxyd gebildet werden, und zwar durch Oxydation von aktiviertem Wasserstoff mit molekularem Sauerstoff als Acceptor.

In gewissem Gegensatz zu der Atmungstheorie Wielands stehen die von Warburg³⁾ vertretenen Anschauungen. Ausgehend von der Tatsache, daß nach dem gegenwärtigen Stand unserer Kenntnisse jede lebende Zelle Eisen enthält, und die seit Lavoisier vielfach betonte Sentenz übernehmend, daß Leben ohne Eisen unmöglich ist, entnimmt Warburg früheren und besonders eigenen experimentellen Ergebnissen die Behauptung: „Der sauerstoff-übertragende Bestandteil des Atmungsfermentes ist Eisen.“ An die Seite spezifischer chemischer Kräfte stellt Warburg als wesentlichen Faktor bei der Atmung der lebenden Substanz die unspezifischen Oberflächenkräfte: „Die Atmung ist eine Reaktion an Oberflächen.“

¹⁾ Wieland, B. 55, 3639 [1922]; siehe auch B. 45, 484 [1912], 47, 2085 [1914], 54, 2353 [1921]. — Wieland und Bergel, A. 439, 196 [1924].

²⁾ O. Loew, U. S. Dep. Agric. Rep. 68 [1901].

³⁾ O. Warburg, siehe den zusammenfassenden Vortrag B. 58, 1001 [1925] und Bio. Z. 152, 479 [1924].

Das Ziel der hier in aller Kürze mitgeteilten, auf Veranlassung von Prof. v. Euler angestellten Untersuchung war, an derjenigen Komponente des Oxydo-Reduktions-Systems der Zellen, welche durch die katalytische Wirkung auf Hydroperoxyd gekennzeichnet ist, also an der sog. Katalase, Zusammenhänge zwischen Wirksamkeit und Eisen-Gehalt aufzusuchen³⁾.

Die notwendige Voraussetzung für eine erfolgreiche Bearbeitung des angedeuteten Problems ist natürlich eine möglichst weitgehende Befreiung der katalase-haltigen Extrakte von inaktiven Verunreinigungen, und deswegen mußten die Reinigungsarbeiten früherer Forscher fortgesetzt und die Methoden ergänzt werden; meine diesbezüglichen Ergebnisse bilden den ersten Teil dieser Mitteilung.

Im zweiten Teil wird die Inaktivierung der Katalase durch Blausäure behandelt. Warburg kommt zum Schluß, „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“.

Wie ich einleitend hervorheben will, fälle ich auf Grund meiner Versuche keine Entscheidung darüber, ob und in welchem Grad die Warburgschen Schlüsse über die Atmung als Eisen-Katalyse und als Oberflächenverbrennung allgemein zutreffen; ich glaube aber wohl, daß meine Untersuchungen zur Präzisierung der Fragestellung auf diesem vielbesprochenen und wichtigen Gebiet der Biochemie beitragen können.

I. Reinheit und Wirkungsfähigkeit von Katalase-Präparaten und ihr Eisen-Gehalt.

In meiner ersten Mitteilung⁴⁾ über die Reinigung der Katalase, und zwar des aus Leber gewonnenen Enzymes wurde als Maß der Aktivität nach einem Vorschlag von Euler und Josephson⁵⁾ der Quotient aus der monomolekularen Reaktionskonstante k der Hydroperoxyd-Spaltung und der angewandten Enzym-Menge (= Trockengewicht der angewandten Enzym-Lösung) gewählt. Dieser Quotient,

$$\text{Kat. } f = \frac{\text{Reaktionskonstante } k}{g \text{ Enzym-Präparat}}$$

wurde auch für einige ältere Präparate, die in einer Tabelle von Madinaveitia zusammengefaßt waren, berechnet. Ich stelle dieselben mit meinen jetzigen Endpräparaten in folgender Tabelle⁶⁾ zusammen:

^{3a)} Anmerkung bei der Korrektur: Nachdem diese Mitteilung abgesandt war, wurde mir die letzte Abhandlung von Wieland in den „Annalen“ bekannt, die teilweise die gleiche Frage behandelt. Ich werde in einer ausführlicheren Mitteilung auf die Ergebnisse Wielands zurückkommen.

⁴⁾ Bio. Z. 145, 286 [1924]. ⁵⁾ B. 56, 1749 [1923].

⁶⁾ In meiner ersten Mitteilung wurden die Kat.-f-Werte bezogen auf das Trockengewicht der Reaktionslösung per 1000 ccm. In Analogie mit analogen Ausdrücken für die Wirksamkeit anderer Enzyme beziehe ich hier das Trockengewicht auf das angewandte Reaktionsvolumen, 50 ccm. Dadurch werden die Werte von Kat. f 20-mal größer als die früher angegebenen.

Katalase-Präparat	g Trockensubstanz in der Reaktionsmischung für $K = 0.0107$	Kat. f
„Kolloidales Platin“	0.3×10^{-3}	35.6
Madinaveitias Hämase	0.0153×10^{-3}	699.4
Senters Hämase	0.235×10^{-3}	45.6
v. Eulers Fett-Katalase	0.075×10^{-3}	142.6
Battellis Hepato-Katalase	0.008×10^{-3}	1337.6
Sörensens Leber-Katalase	0.017×10^{-3}	629.4
S. Hennichs ⁷⁾		
nach zwei $Al(OH)_3$ -Adsorptionen		10422
nach Kaolin-Adsorption		10640
meine neuen Präparate		
nach zwei $Al(OH)_3$ -Adsorptionen		10872
		11442
nach Kaolin-Adsorption		22250
		20440
		25000

Diese meine letzten Präparate konnten außerdem in bedeutend größeren Mengen hergestellt werden, als es früher der Fall war, so daß dieselben durch analytische Daten charakterisiert werden konnten. Dieses konnte selbstverständlich nur durch eine wesentliche Verbesserung meiner früheren Reinigungsmethode erreicht werden.

Tabelle 1.

Präparate Nr.	Kat. f	Gewicht	Aschen-Gehalt	Eisen-Gehalt
1	11442	0.1044 g	11.33 %	3.33 %
2	10872	0.0144 g	11.68 %	3.89 %
3	20440	0.0510 g	—	—
4	25000	0.2520 g	12.09 %	4.12 %

Die Extraktion meines Ausgangsmaterials, zerkleinerter Leber von frischgeschlachteten Pferden, mit der gleichen Menge destillierten Wassers, hat sich als durchaus zweckmäßig gezeigt, ja sogar zwischen 300 und 400 % Aktivitätsausbeute in der Kolierflüssigkeit ergeben, da konstatiert wurde, daß ein Hemmungskörper zurückblieb. Temperatur und Acidität brauchten bei der Extraktion nicht berücksichtigt zu werden. Dagegen erforderte Battellis und Sterns Ausfällungsmethode mit Alkohol eine wesentliche Revision, welche auch zu einer besonders zweckmäßigen fraktionierenden Fällungsmethode mit Alkohol geführt hat. Durch Fällung des Leber-Extraktes mit seinem halben Volumen Alkohol wurde derselbe nicht allein von einem wesentlichen Teil inaktiver Trockensubstanz befreit, sondern auch von einem Hemmungskörper, so daß eine wirksamere Restlösung zurückbleibt. Die gleiche Aktivierung kann mittels Toluols erreicht werden. Wenn diese Lösungen mit ihrem gleichen Volumen Alkohol gefällt werden und die Fällung unmittelbar darauf mit Wasser vermengt und geschüttelt wird, erhält man

⁷⁾ Bio. Z. 145, 286 [1924].

aus $\frac{1}{2}$ kg Leber klare, hochrote Lösungen mit 2.5—3.5 g Trockensubstanz und einer Aktivität innerhalb der Grenzen Kat. f = 4000—6600.

Hierauf hat das Adsorptionsverfahren begonnen mit Na_2HPO_4 -Lösungen von geeigneter Stärke als Elutionsflüssigkeit.

Die Endpräparate sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Ein Sammelpräparat von Enddialysen nach wiederholten Kaolin-Adsorptionen mit Battellis und Sterns Hepatokatalase als Ausgangspunkt zeigte eine Aktivität von Kat. f 10113.2, Aschen-Gehalt 12.76 % und Eisen-Gehalt 3.67 %. Dieses und das Präparat 1, 2 und 4 der obenstehenden Tabelle sollen im Nachstehenden näher behandelt werden.

Diese Präparate sind in $\frac{1}{100}$ -n. H_2O_2 -Lösung untersucht worden. Um einen Vergleich mit Warburgs entsprechenden Ziffern zu erhalten, mußten die umgesetzten Sauerstoff-Mengen per Eisen-Menge berechnet werden; die direkt erhaltenen Zahlen konnten nicht zugrunde gelegt werden, weil die Versuchszeiten nur 25 Min. betragen. Da die Zersetzungskurve logarithmisch ist, kann nicht proportioniert werden.

Tabelle 2.

Aktivität	Trockengewicht in 50 ccm Reaktionsmischung	Eisen-Gehalt colorim. best.	cm ³ O ₂ /(mg Fe × Stunde)
10113.2	0.000004	3.67 %	19000000
11442	0.0000036	3.33 %	23280000
10872	0.0000008	3.89 %	62930000
25000	0.00000036	4.12 %	134400000

Die Ziffern in der letzten Spalte wurden auf folgende Weise erhalten. Gestützt auf die bekannte Aktivität, Trockengewicht per Reaktionsmischung (50 ccm) sowie die Versuchszeit von 60 Min. sind die Endkonzentrationen in der Lösung berechnet worden. Mit Hilfe der letztgenannten und der ursprünglichen (0.01-n. H_2O_2) ergibt sich die entwickelte Menge Sauerstoff, diese wurde mit der Eisen-Menge dividiert.

Dieser Berechnungsgrund hat jedoch den Nachteil, daß der Totalumsatz am Schluß der Reaktion geringer wird, weswegen auch die Werte sinken, je größer die zur Aktivitätsbestimmung verwendete absolute Menge Enzym ist.

Für Warburgs⁸⁾ vermutlich beste Kohlensorte ist die entsprechende Ziffer 24231 cm³/(mg Fe × Stunde), also bedeutend geringer, obgleich dieser Wert mit Cystin erhalten wurde, welches bedeutend leichter oxydiert wird als schwefelfreie Eiweißstoffe bzw. Aminosäuren.

Um für die letztgenannte Größe eigene Zahlen zu erhalten, wurde die Einwirkung der Blutkohle auf Alanin studiert. Die hierbei angewandte Methodik ist dieselbe, deren sich Wieland und Bergel⁹⁾ bei ihren entsprechenden Versuchen bedienten. Dieselbe ist allerdings nicht durchaus befriedigend, aber wohl die einzig zur Verfügung stehende. Um beim Ausblasen von Kohlensäure mit Hilfe von Sauerstoff einen Verlust von Acetaldehyd zu verhindern, wurden vor Beginn der Prozedur die Kolben

⁸⁾ Bio. Z. 152, 481. ⁹⁾ A. 439, 196 [1924].

auf 0° abgekühlt. Bei der darauffolgenden Destillation können natürlich auch Verluste entstehen.

Als Katalysator wurde Kahlbaums „Blutkohle“ angewandt. Die Versuchstemperatur im Thermostat $37^{\circ} \pm 0.1^{\circ}$; Versuchszeiten 24 Stunden.

Tabelle 3.

Abhängigkeit der Oxydation von der Katalysatormenge (0.1 g Alanin).

Kohlen- Menge in g	Erhaltene Menge					
	CO ₂		CH ₃ .CHO		CH ₃ .CO ₂ H	
	in mg	% d. theoret.	in mg	% d. theoret.	in mg	% d. theoret.
2.0	20.1	40.68	7.4	14.97	5.5	8.16
1.0	17.7	35.83	7.4	14.97	5.5	8.16
0.5	8.6	17.42	3.7	7.49	2.8	4.16
0.1	4.6	9.31	1.9	3.85	1.9	2.82

Wie ersichtlich, wurde ziemlich früh ein Maximum des Umsatzes erzielt.

Tabelle 4.

Einwirkung der Alanin-Menge bei konstanter Kohlen-Menge von 1 g.

Alanin- Menge in g	Vol.-Ver- minderung in ccm	Gebildete Menge					
		CO ₂		CH ₃ .CHO		CH ₃ .CO ₂ H	
		in mg	% d. theoret.	in mg	% d. theoret.	in mg	% d. theoret.
0.2	1.85	18.0	18.2	14.9	15.0	5.5	4.1
0.3	2.35	19.0	12.8	23.6	15.9	7.3	3.6
0.4	2.85	26.0	12.9	25.8	13.3	9.2	3.41
0.5	2.95	26.5	10.7	25.8	10.4	9.2	2.73

Wie aus der obenstehenden Tabelle hervorgeht, kommt man auch hierbei sehr schnell zu einem Maximum des Umsatzes.

In der zweiten Spalte sind die Volumen-Ver minderungen verzeichnet. Diese können zufolge besonderer Prüfung sicher nicht auf Gasverluste zurückgeführt werden. Außerdem entstanden diese Verringerungen bei einem Unterdruck in den Kolben. Die Volumen-Verringerung beruht auch nicht auf Adsorption von Sauerstoff an Kohle, denn eine Blindprobe mit 1 g Kohle, 5 ccm H₂O und Sauerstoff-Atmosphäre ergab negatives Resultat.

Die Erscheinung dürfte dadurch hervorgerufen werden, daß die Kohlensäure an das gleichzeitig gebildete Ammoniak gebunden und von der Lösung zurückgehalten wird. Es ist nicht ersichtlich, ob Warburg bei seinen Versuchen, bei denen nur die Druckverringerungen studiert wurden, allerdings mit Korrektur für die Löslichkeit des entwickelten Gases in der Flüssigkeit, diesen Umstand genügend berücksichtigt hat. Die Löslichkeit des Gases ist nämlich nicht konstant, sondern eine Funktion der gebildeten Menge Ammoniak.

Der Eisen-Gehalt des benutzten Kohlen-Präparates war 3.98% und der Aschen-Gehalt 21.61%, also besonders hoch.

Nach Veraschung auf dem Meker-Brenner wurde 1 g des Kohlen-Präparates zum Konstantgewicht auf der Stichflamme geglüht. Das Eisen wurde nach Aufschluß mit Soda in einer Platinschale jodometrisch bestimmt.

Der höchste Umsatz in den umstehend angeführten Tabellen ist die Bildung von 4.6 mg CO_2 mit 0.1 g Kohle. Berechnet man die Oxydationsaktivität auf das Eisen, so erhält man:

588.2 cmm/mg Fe per 24 Stunden,

ein Ergebnis, das ja ganz bedeutend niedriger ist, als das von Warburg gewonnene. Dies liegt zum Teil daran, daß der fragliche Eiweißstoff schwefelfrei ist, und zum Teil an dem unnötig hohen Eisen-Gehalt meiner Kohle.

Ein Präparat, Mercks Adsorptionskohle, welches ungefähr die gleiche Aktivität aufwies, hatte einen Aschen-Gehalt von 2.72 % und einen Eisen-Gehalt von 0.46 %. Hierbei würde die Aktivität des Eisens etwa 10-mal größer sein, als dem obengenannten Werte entspricht.

Diese Zahlen beleuchten somit die enorme Aktivität meiner Präparate. Bemerkenswert ist der verhältnismäßig übereinstimmende Eisen-Gehalt.

In seinen Arbeiten über Peroxydase findet Willstätter¹⁰⁾ einen Umsatz von 297—355 Mol. H_2O_2 per Sekunde und Atom Eisen. Mein bestes Präparat in der obengenannten Tabelle Nr. 2, umgerechnet nach diesem Prinzip, ergibt 186.13.

2. Vergiftung von hochaktiven Katalase-Präparaten durch Blausäure.

Ein nach Battelli und Stern dargestelltes Leberkatalase-Präparat ergab beim Schütteln mit Wasser Enzym-Lösungen, deren Trockengewicht einen Aschen-Gehalt von 10.01 % und einen Eisen-Gehalt von 2.37 % aufwies. Die Trockensubstanz der Präparate, die durch Kaolin-Adsorption von diesen Ausgangslösungen gewonnen wurde, ergab 12.76 % Asche und 3.67 % Eisen.

Eine Enzym-Lösung von 230 ccm aus dem erstgenannten Präparat hatte Kat. f 862.6. Am darauffolgenden Tage war eine kleine Fällung eingetreten, welche abfiltriert wurde. Die Trockensubstanz ergab hierauf 0.4347 g mit Kat. f = 1137.8. Nach Kaolin-Adsorption und Elution sowie Dialyse, wobei 25 % der Aktivität verloren gingen, war das Endresultat 0.0101 g mit Kat. f = 8086.0. Aktivitätssteigerung 1:7.107.

In sämtlichen Stadien der Entwicklung wurde das Verhalten der Präparate zur Blausäure geprüft, wie die nachstehenden Tabellen angeben.

Tabelle 5.
Kat. f = 862.6.

$n\text{-HCN} \times 10^6$	Reaktionskonstante	Vergiftungsgrade %
—	0.0424	—
1.519	0.0263	38.00
3.038	0.0184	56.61
4.557	0.0153	63.92
6.076	0.0102	75.94

¹⁰⁾ A. 416, 62 [1918].

Kat. f = 1137.8.

$n\text{-HCN} \times 10^6$	Reaktionskonstante	Vergiftungsgrade %
—	0.0219	—
1.519	0.0115	47.49
3.038	0.0087	60.27
4.557	0.0056	74.42
6.076	0.0039	82.19
Nach Elution.		

$n\text{-HCN} \times 10^6$	Reaktionskonstante	Vergiftungsgrade %
—	0.0338	—
0.3797	0.0296	12.42
0.7595	0.0255	24.56
1.1392	0.0168	50.30
3.038	0.0035	89.64
Kat. f = 8086.0.		

$n\text{-HCN} \times 10^6$	Reaktionskonstante	Vergiftungsgrade %
—	0.0345	—
0.4822	0.0338	2.03
1.9288	0.0132	61.74
4.822	0.0063	81.73

Bei einem anderen Versuch betrug die Ausgangsaktivität 1365.0, die Inaktivierung während der Dialyse 68.8%, die Endaktivität 22250.0 und die Aufaktivierung 1:16.30. Die Kurve auf S. 225 veranschaulicht die Empfindlichkeit gegenüber Blausäure.

Das Verhältnis zwischen den Eisen-Gehalten im Ausgangs- und Endpräparat beträgt laut dem vorstehend Ausgeführten 1:1.55. Die Aktivierung betrug im ersteren Falle 1:7.107. Die Reaktionskonstante belief sich auf 0.0424 im ersteren Falle und 0.0345 in der Endlösung. Das Verhältnis zwischen den Eisen-Mengen ist somit:

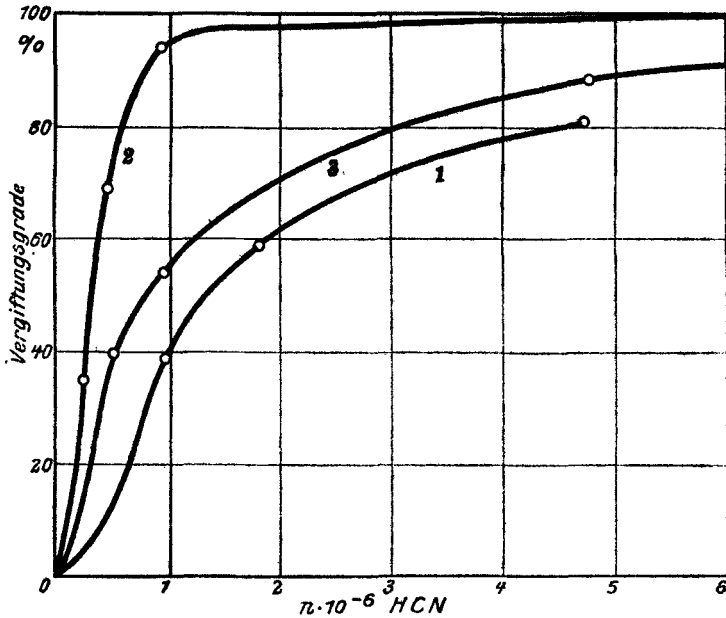
$$\frac{1}{1.55} \times \frac{0.0424}{0.0345} \times 7.107 = 5.64.$$

Bei der ersten Lösung trat 40-proz. Vergiftung in ca. 1.6×10^{-6} n-HCN und bei der letzten in ca. 1.0×10^{-6} n-HCN ein. Die Blausäure-Mengen verhalten sich somit zueinander wie 1:1.6.

Im letzten Versuch verhalten sich die Eisen-Mengen wie 1:8.56 und die Normalitäten der Blausäure für 40%-Vergiftung waren 1.0×10^{-6} und 0.5×10^{-6} .

Die höchstaktive der obengenannten Enzym-Lösungen enthielt 0.006 g Trockensubstanz auf 10 ccm und ergab 1:25 K = 0.0534, hieraus Kat. f

= 22250.0. Zu 50 ccm Reaktionsmischung wurden also 2.4×10^{-6} g Trockensubstanz oder 8.81×10^{-8} g Eisen verwendet. Zur Vergiftung dieser Menge war 10^{-6} n-HCN nötig = 1.351×10^{-6} g. Die Größenordnung der Gewichtsmenge ist also bei Enzym und Blausäure ungefähr die gleiche.



Kurve 1.

1. Kat. f = 1365.0; 2. nach Elution; 3. Kat. f = 22250.0.

Es ergab sich ferner, daß die Empfindlichkeit meiner Präparate gegenüber Blausäure nicht größer ist als z. B. bei Selters Präparaten, obwohl die letztgenannten eine bedeutend geringere Aktivität aufweisen.

Für den Warburgschen Satz, daß die Wirkung der Blausäure auf das Atmungs-(Oxydo-Reduktions)-System in der Bindung des katalytisch wirkenden Eisens besteht, bilden die hier beschriebenen Versuche über Katalase jedenfalls keine Stütze.