

Tabelle 3.

Einwirkung von Trypsin-Kinase.

(10 mg Insulin; V.: 2, VI.: 5 ccm erepsin-freie Trypsin-Lösung¹⁰⁾ mit 1.0 T.-(e.), aktiviert durch 0.5 ccm Enterokinase-Lösung; 0.02 ccm *n.* NaOH; Gesamtvolumen 10.0 ccm; $p_H = 7.6$, 30°; Einwirkungsdauer 4 Stdn.; injiziert 7.0 ccm Lösung, entspr. 7 mg Insulin.)

Vers.-Nr.	Versuchstier	Gewicht g	Blutzucker (mg %)		Bemerkungen
			zuvor	nach 3 1/2 Stdn.	
V	Insulin-Tier	2180	100; 100	100; 101	
	Kontroll-Tier	1460	103; 103	102; 103	
VI	Insulin-Tier	1190	125; 120	91; 96	Gehalt infolge Narkose vor Injektion übernormal
	Kontroll-Tier	1230	148; 140	106; 104	

Tabelle 4.

Einwirkung von Pepsin.

(10 mg Insulin; 5.0 mg Pepsin (Merck, Brit. Pharm.); 1.20 ccm 0.1-*n.* HCl; Gesamtvolumen 5.0 ccm; $p_H = 2.0$, 30°; Einwirkungsdauer 3 1/2 Stdn.; injiziert 3.5 ccm Lösung, entspr. 7 mg Insulin.)

Vers.-Nr.	Versuchstier	Gewicht g	Blutzucker (mg %)		Bemerkungen
			zuvor	nach 3 1/2 Stdn.	
VII	Insulin-Tier	2300	112; 110	100; 100	
	Kontroll-Tier	1680	110; 108	105; 106	

Frl. Dr. A. Harteneck und Hrn. A. Schäffner danken wir für ihre experimentelle Hilfe.

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft schulden wir für die gewährten Mittel besonderen Dank.

378. Richard Kuhn und Ludwig Brann: Über die Abhängigkeit der katalatischen und peroxydatischen Wirkung des Eisens von seiner Bindungsweise¹⁾.

[Aus d. Chem. Laborat. d. Bayer. Akad. d. Wissenschaften in München.]

(Eingegangen am 6. September 1926.)

Der Einfluß der chemischen Bindung auf das katalytische Wirkungsvermögen von Elementen ist in sehr zahlreichen Fällen erkannt und auch praktisch ausgewertet worden²⁾. Es ist aber im allgemeinen nicht möglich, chemische Konstitution und katalytische Wirksamkeit zahlenmäßig zu vergleichen. Denn die gesuchten Beziehungen werden bei den meist

¹⁰⁾ Nach E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck, H. 147, 286, und zwar S. 306 [1925].

¹⁾ Der wesentliche Inhalt der vorliegenden Abhandlung wurde erstmalig in der Sitzung der Züricher Chemischen Gesellschaft vom 18. Mai 1926 vorgetragen.

²⁾ Eine Übersicht gab A. Mittasch, B. 59, 13 [1926].

untersuchten heterogenen und mikro-heterogenen Katalysen überdeckt durch den Einfluß der Gitterkräfte und der Verteilung. Wie groß die Schwierigkeiten bei der Untersuchung kolloider Katalysatoren sind, zeigen die Versuche von St. Ruzsnyák³⁾, der bei Goldsolen wechselnder Dispersität die hydroperoxyd-zersetzende Kraft mit zunehmendem Verteilungsgrade abnehmen sah⁴⁾. Es erscheint selbst bei Berücksichtigung der Oberflächen-Gestaltung aussichtslos, etwa Sole verschiedener Metalle hinsichtlich einer bestimmten katalysierbaren Reaktion durch Zahlen zu kennzeichnen, die als konstante Eigenschaft der betreffenden Elementar-Atome gelten könnten. Aussichts-voll erscheint es, mit Derivaten, die in homogene, echte Lösung überführbar sind, dieser Frage näher zu treten, und einerseits verschiedene Elemente in Form entsprechender Derivate, andererseits ein bestimmtes Element in verschiedenen Bindungsformen zu prüfen.

Die Untersuchung des Eisens von diesen Gesichtspunkten aus ist auch in physiologischer Hinsicht wichtig. O. Warburg⁵⁾ erblickt im Eisen den sauerstoff-übertragenden Bestandteil des Atmungsferments der Zellen und Gewebe. In seinen Modellversuchen über Oberflächen-Katalyse fand er, daß eine bestimmte Eisenmenge sehr verschieden starke Wirkung haben kann, je nach dem Stickstoff-Gehalt der als Träger angewandten Kohlen⁶⁾. O. Warburg nimmt an, daß das Schwermetall in verschiedener chemischer Bindungsweise vorliege⁷⁾.

Wir haben die oxydations-katalytischen Eigenschaften des Oxy-hämoglobins verglichen mit denjenigen wohldefinierter Umwandlungs- und Abbauprodukte des Blutfarbstoffs, die der Untersuchung in homogener wäßriger Lösung zugänglich waren. Wir prüften:

1. Oxydase-Wirkung, die Übertragung molekularen Sauerstoffs,
2. Peroxydase-Wirkung, die Übertragung peroxydisch gebundenen Sauerstoffs,
3. Katalase-Wirkung, die katalytische Zerlegung des Wasserstoff-peroxyds in Sauerstoff und Wasser.

Bei keiner der untersuchten Verbindungen ist es unter den für die Peroxydase-Reaktion beschriebenen Bedingungen gelungen, mit Jodwasserstoffsäure als Acceptor auch nur spurenweise Oxydase-Wirkung festzustellen. Die Fähigkeit, molekularen Sauerstoff zu übertragen, scheint sehr von der Natur des Acceptors abzuhängen, denn in einer vor 2 Jahren erschienenen Abhandlung berichtete M. E. Robinson⁸⁾ über die katalytische Oxydation von Leinöl durch Luft-Sauerstoff unter dem Einfluß von Blutfarbstoff und Hämmin.

Die vielfach untersuchten peroxydatischen Eigenschaften des Oxy-hämoglobins (HbO₂) schienen nach den Beobachtungen von H. Wu⁹⁾

³⁾ Ph. Ch. **85**, 681 [1913].

⁴⁾ Vermutlich variiert die Natur der aufladenden Komplex-Ionen; vergl. W. Pauli, Koll.-Ztschr. **28**, 49 [1921]; Trans. Farad. Soc. **16**, 14 [1921]; L. Fuchs und W. Pauli, Koll. Beih. **21**, 195, 412 [1925]; W. Pauli, Koll.-Ztschr. **38**, 22 [1926]. Die Bedeutung der ionogenen Beladung für die Katalyse durch Metallsole wurde erörtert von R. Kuhn in C. Oppenheimers Handbuch der Fermente, Leipzig 1924, G. Thieme, Bd. I, S. 165.

⁵⁾ B. **58**, 1001 [1925].

⁶⁾ O. Warburg und W. Brefeld, Bio. Z. **145**, 461 [1924].

⁷⁾ a. a. O., S. 466. ⁸⁾ Bioch. Journ. **18**, 255 [1924].

⁹⁾ Journ. of Biochemistry [Tokio] **2**, 173, 181, 189, 195 [1923].

sehr uninteressant zu sein. Nach H. Wu sollten Peroxydase- und Katalase-Wirkung Hand in Hand gehen und sich bei den Abbauprodukten des Blutfarbstoffs entsprechend deren Eisengehalt in genau gleicher Weise wiederfinden. Wir kommen zu dem Ergebnis, daß im Gegenteil schon geringfügige chemische Veränderungen des Moleküls in unerwartetem Maße nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ das Wirkungsvermögen verändern.

Daß die von L. J. Thénard¹⁰⁾ entdeckte Katalase-Wirkung des Blutes nichts mit dem HbO_2 zu tun hat, ist zuerst von G. Senter¹¹⁾ mitgeteilt und später von R. Willstätter und A. Madinaveitia¹²⁾ bewiesen worden, deren Ergebnis A. Kultjugin¹³⁾ vor kurzem bestätigt hat. Auch wir konnten bei Anwendung mehrfach umkrystallisierter HbO_2 -Präparate selbst bei weitgehender Variation der p_{H} -Bedingungen ($p_{\text{H}} = 4.5-8.3$) keine Hydroperoxyd-Zersetzung beobachten. Die abweichenden Angaben von H. Wu beruhen nach unseren Erfahrungen teils auf zu hoher Alkaleszenz ($n/5$ -NaOH), teils darauf, daß die zur Entfernung der Blut-Katalase vorgenommene wiederholte Behandlung der HbO_2 -Lösungen mit Aluminiumhydroxyd¹⁴⁾ nicht gestattet, die letzten Spuren des Enzyms mit Sicherheit zu beseitigen.

Mit Hilfe des schön krystallisierenden HbO_2 läßt sich prüfen, ob bei hochmolekularen organischen Katalysatoren zwischen isoelektrischem Punkt und p_{H} -Optimum der Wirkung Beziehungen herrschen. Nach H. v. Euler¹⁵⁾ sollte z. B. das Wirkungs-Optimum der Saccharase mit dem isoelektrischen Punkt dieses Fermentes zusammenfallen. Wir finden für die Beschleunigung der Jod-Ausscheidung aus Hydroperoxyd + Jodkalium bei Anwendung von HbO_2 aus Pferdeblut $p_{\text{H}} 5.0-5.5$ optimal. Beim isoelektrischen Punkt des Oxy-hämoglobins $p_{\text{H}} = 6.8$ ¹⁶⁾ sind nur noch 50% der maximalen Wirksamkeit vorhanden. Mit Pyrogallol als Acceptor wird die größte Farbstoff-Ausbeute etwa bei $p_{\text{H}} 5$ erhalten.

Der Satz von E. von Czyhlarz und O. von Fürth¹⁷⁾, die Jodwasserstoffsäure sei „ein empfindliches Peroxydasen-Reagens, das mit Hämoglobin und Hämatin nicht reagiert“, gilt, wie die Figg. 4 und 5 erkennen lassen, nur in einem verhältnismäßig engen Gebiete hoher Aciditäten. Die ungleiche Abhängigkeit des HbO_2 und der echten Peroxydasen vom Säuregrad ist ohne direkte p_{H} -Bestimmung schon von J. Wolff und E. de Stoecklin¹⁸⁾ erkannt worden.

HbO_2 wirkt peroxydatisch, ohne in nachweisbarem Maße die Zersetzung von H_2O_2 zu beschleunigen. Bauen wir die Verbindung ab zum Hämin, so finden wir — immer auf gleiche Eisenmengen bezogen — die Peroxydase-Wirkung geschwächt, ohne bedeutende Verschiebung der p_{H} -Kurve. Aber in der neuen Bindung tritt das Eisen plötzlich als Katalase auf. 3 mg Hämin zerlegen bei $p_{\text{H}} 5.7-7.5$ und 0^0 in 60 Min. 25–30% von 200 ccm 0.017 -n. H_2O_2 -Lösung. Die Katalase-Wirkung stimmt für Hämin-Präparate ver-

¹⁰⁾ A. ch. [2] **9**, 441 [1818], **10**, 114, 335 [1819], **11**, 85 [1819].

¹¹⁾ Ph. Ch. **44**, 257 [1903].

¹²⁾ Promotionsarbeit von A. Madinaveitia, Zur Kenntnis der Katalase, Zürich 1912.

¹³⁾ Bio. Z. **167**, 238 [1926].

¹⁴⁾ Wir benützten die adsorptions-tüchtige Tonerde C_7 .

¹⁵⁾ H. v. Euler und K. Josephson, H. **133**, 279 [1924], und zwar S. 289ff.

¹⁶⁾ L. Michaelis und Y. Airila, Bio. Z. **118**, 144 [1921]; R. M. Ferry, Journ. Biol. Chem. **57**, 819 [1923].

¹⁷⁾ Hofm. Beitr. **10**, 366 [1907]. ¹⁸⁾ C. r. **151**, 483 [1910].

schiedener Herkunft genau überein, und sie ist ebenso wie die Peroxydase-Wirkung eines bestimmten HbO_2 ¹⁹⁾ unabhängig von der Anzahl der KrySTALLISATIONEN. Die Hämin-Katalase ist ausgezeichnet durch geringe p_{H} -Abhängigkeit und durch einen selbst im Vergleich mit den echten Katalasen sehr niedrigen Temperatur-Koeffizienten. Es liegt hier der höchstens bei Photoreaktionen beobachtete Fall vor, daß die Reaktionsgeschwindigkeit bei Erhöhung der Temperatur um 10^0 nur um 5% zunimmt. Auffallend indifferent ist die Hämin-Katalase gegen Blausäure. Erst wenn etwa 1500 Mol. HCN auf 1 Fe treffen, sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit auf die Hälfte. Worauf die Hemmung beruht, steht noch nicht fest. Jedenfalls ist die Empfindlichkeit der Reaktion gegen Blausäure ungemein geringer, als in den von O. Warburg untersuchten Eisen-Katalysen²⁰⁾.

Der Wirksamkeitsvergleich zweier Eisen-Komplexe läßt sich nicht durch eine einzige Zahl erschöpfen, da die Reaktionsgeschwindigkeiten in ungleichem Maße von äußeren Faktoren abhängen. Diese sind bei jedem Vergleich genau anzugeben. Am Beispiel der Hämin-Peroxydase beschreiben wir im Versuchsteil die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration des Hämins, des Hydroperoxyds und des Jod-Ions, die Abhängigkeit von der Verdünnung, vom p_{H} , von der Temperatur, von der Art der Neutralsalze und von der Zeit. Es wird ferner zu prüfen sein, wie weit bei verschiedenen Katalysatoren die peroxydatischen Reaktionsgeschwindigkeiten, wenn man sie mit verschiedenen Acceptoren mißt, Hand in Hand gehen. Eine Abhängigkeit von der Belichtung hat sich weder für die Peroxydase-, noch für die Katalase-Wirkung des Hämins nachweisen lassen²¹⁾.

Die Übertragungs-Geschwindigkeit des Peroxyd-Sauerstoffs auf Jodwasserstoffsäure durch Hämin läßt sich nur aus einem Gewirr von vier gleichzeitig ablaufenden, H_2O_2 verbrauchenden Reaktionen herauschälen. Diese Reaktionen²²⁾, die nicht unabhängig voneinander ablaufen, sind:

- I. Die Katalase-Wirkung des Hämins,
- II. Die katalytische H_2O_2 -Zersetzung durch Jod-Ion²³⁾,
- III. Die nicht-katalysierte Jod-Ausscheidung aus Hydroperoxyd + Jodid²⁴⁾,
- IV. Die gesuchte Peroxydase-Wirkung.

Überdies tritt Schädigung des Hämins durch H_2O_2 ein. Diese Schädigung erklärt die Abweichung der reinen Hydroperoxyd-Zersetzung vom Zeitgesetz erster Ordnung, das auf Grund der Unabhängigkeit der Hämin-Katalase vom Reaktionsvolumen zu erwarten war.

Von den beiden simultanen Katalase-Reaktionen I und II finden wir die Jod-Ion-Wirkung im Gegensatz zu I ungemein abhängig vom p_{H} (Fig. 1). Bei den simultanen Peroxydase-Reaktionen III und IV ist umgekehrt die Hämin-Wirkung sehr stark p_{H} -abhängig, während die Reaktion ohne Katalysator in weiten Grenzen gegen Aciditäts-Änderungen unempfindlich ist.

¹⁹⁾ R. Willstätter und A. Pollinger, H. **130**, 281 [1923].

²⁰⁾ B. **58**, 1001 [1925].

²¹⁾ H. Gaffron, Naturw. **13**, 859 [1925], fand, daß Hämatoporphyrin im Licht Sauerstoff auf Eiweiß überträgt.

²²⁾ Sie lassen sich noch in weitere Teilvorgänge zergliedern.

²³⁾ J. H. Walton jr., Ph. Ch. **47**, 195 [1904].

²⁴⁾ A. A. Noyes, Ph. Ch. **18**, 131 [1895]; J. Brode, Ph. Ch. **37**, 257 [1901]; E. Spitalsky, Ph. Ch. **113**, 161 [1924]; E. Abel, Z. El. Ch. **28**, 489 [1922].

Die Geschwindigkeit von IV nimmt bei 50000-facher Steigerung der H-Ionen-Konzentration gegenüber dem Neutralpunkt, zwischen p_H 6.88 und p_H 2.35, nur um 5% zu (Figur 2).

Aus den Wechselwirkungen zwischen den angeführten Teilvorgängen tritt besonders scharf hervor die Hemmung der Hämin-Katalase (I) durch Jod-Ion. Sie beruht darauf, daß in Gegenwart von J' nur ein Teil der am Hämin aktivierten Hydroperoxyd-Moleküle in Sauerstoff und Wasser zerfällt, ein anderer Teil aber für peroxydatische Jod-Ausscheidung verbraucht wird. Denn wenn wir die Summe der peroxydatisch und katalatisch in Reaktion getretenen H_2O_2 -Mengen bestimmen, so finden wir sie ungefähr übereinstimmend mit der H_2O_2 -Menge, die in Abwesenheit von Jodkalium durch das Hämin gespalten wird.

Lagert man an das Hämin zwei Wasserstoff-Moleküle an (Meso-hämin), so tritt bei dem für Hämin annähernd optimalen p_H 5 keine Beschleunigung der H_2O_2 -HJ-Reaktion ein. Durch die Hydrierung ist aber die Peroxydase-Wirkung nicht gänzlich erloschen, sondern nur die p_H -Abhängigkeit stark verschoben worden. Meso-hämin wirkt optimal bei p_H 6.4–6.5, und jenseits des Neutralpunktes übertrifft sogar seine peroxydatische Wirkung die der nicht hydrierten Verbindung (Fig. 3). Grundsätzlich unterscheiden sich Hämin und Meso-hämin hinsichtlich der Katalase-Wirkung, die dem Meso-hämin — soweit dies unsere Versuchsmethodik zu entscheiden gestattet — vollkommen abgeht. Das Ergebnis stimmt für Präparate verschiedener Darstellung überein. Auf gleichen Eisengehalt bezogen, ist Meso-hämin eine mindestens 10-mal schwächere Katalase als Hämin (bei p_H 5.7–7.9 und o^0).

Noch mehr als die Absättigung der Doppelbindungen macht sich die Veresterung von Carboxylgruppen im Hämin geltend. Im Monomethyl-chlorhämin von W. Küster²⁵⁾, das allerdings nicht in homogener wäßriger Lösung untersucht werden konnte, sind die katalatischen und peroxydatischen Eigenschaften nahezu erloschen^{25a)}. Dasselbe finden wir in Übereinstimmung mit H. Wu²⁶⁾ auch bei tieferegreifendem Abbau des Blutfarbstoffs zu den Porphyrinen, von denen wir das Hämato- und Meso-porphyrin untersucht haben. Das Vorhandensein des Eisens erscheint bei den hier untersuchten Verbindungen als notwendige, wenn auch nicht als hinreichende Bedingung der peroxydatischen und katalatischen Betätigung. Die bloße Gegenwart von Eisen ist aber nicht genügend, denn auch Mischungen der Porphyrine mit Ferro- bezw. Ferri-Salz sind, wie wir fanden, vollkommen unwirksam. Das Schwermetall muß in komplexer Bindung vorliegen.

Auf der Suche nach anderen wirksamen komplexen Eisensalzen haben wir das Tri- α, α' -dipyridyl-ferrobromid von F. Blau²⁷⁾ geprüft, das äußerlich so sehr dem Blutfarbstoff ähnelt, und das Ferro-pentacyanaquo-natrium von K. A. Hofmann²⁸⁾, dessen peroxydatische Eigenschaften O. Baudisch²⁹⁾ rühmt. Im Dipyridyl-Komplex ist das Eisen

²⁵⁾ H. 109, 122 [1920].

^{25a)} Die Prüfung auf Peroxydase fällt mit Jodwasserstoff vollkommen negativ, mit *p*-Phenylendiamin noch stark positiv aus.

²⁶⁾ Journ. of Biochemistry [Tokio] 2, 195 [1923], und zwar S. 204.

²⁷⁾ M. 10, 379 [1890], 19, 650 [1898].

²⁸⁾ A. 312, 1 [1900]. ²⁹⁾ Naturw. 13, 752 [1925].

innerhalb der beim Hämin untersuchten Grenzen weder als Katalase, noch als Peroxydase wirksam. Es vermag in dieser Form nach W. Manchot, im Gegensatz zum Hämoglobin, auch nicht Sauerstoff oder Kohlenoxyd zu binden. Das Pentacyan-aquo-salz ist keine Katalase, die peroxydatischen Eigenschaften treten zwar bei Anwendung von Benzidin bzw. *p*-Phenylendiamin als Acceptoren zu Tage, die Beschleunigung der Jodwasserstoff-Reaktion ist aber bei p_H 6.8 und o^0 unmeßbar gering, ebenso wie bei seinem NO-Analogen, dem Nitroprussid-natrium, aus dem es bereitet wird.

Die leuchtend blauen Komplexverbindungen aus Ferrosalz und Barbitursäure³⁰⁾, sowie aus Ferrosalz und Isonitroso-dimedon³¹⁾ vermögen nicht, H_2O_2 katalytisch zu zersetzen. Mit HJ als Acceptor sind sie anscheinend auch peroxydatisch unwirksam; die genauere Untersuchung, die durch die große Farbtintensität erschwert wurde, steht noch aus.

Es soll hier nicht erörtert werden, inwieweit der Blutfarbstoff und seine Abbauprodukte als Enzym-Modelle gelten können³²⁾. Die von uns an einheitlichen Verbindungen beschriebenen Änderungen der Spezifität, die beim Abbau mit Eisessig, bei der Hydrierung, Veresterung und tiefergreifenden Umwandlungen zutage treten, beweisen: Nicht der Eisengehalt allein und auch nicht die Dispersitätsverhältnisse allein entscheiden über die katalytischen Wirkungen. Es ist vielmehr im Reiche hochmolekularer organischer Katalysatoren die chemische Konstitution für die Wirksamkeit von der allergrößten Bedeutung. Die namentlich von R. Willstätter³³⁾ vertretene stoffliche Auffassung der Fermente rückt damit unserem Verständnis näher.

Als Ferrosalz beschleunigt Eisen, auch wenn es in verhältnismäßig hoher Konzentration angewandt wird, die H_2O_2 -HJ-Reaktion nicht meßbar³⁴⁾. Die kinetische Verfolgung ergibt, daß zwar in den allerersten Augenblicken³⁵⁾ eine bestimmte Jodmenge in Freiheit gesetzt wird, bei längerer Versuchsdauer vergrößert sich aber die Differenz gegenüber der Leerreaktion nicht. Das Eisen tritt als stöchiometrischer Reaktionspartner, nicht als Katalysator auf. Ersetzt man die Jodwasserstoffsäure durch andere Sauerstoff-Acceptoren, wie *p*-Phenylendiamin oder Benzidin, so tritt starke Beschleunigung der Farbstoffbildung ein. Selbst die ohne Zusatz eines Katalysators langsam stattfindende Wechselwirkung zwischen *p*-Phenylendiamin und Hydroperoxyd scheint wenigstens teilweise durch Eisenspuren der üblichen Reagenzien bedingt zu werden, da sie durch Blausäure hemmbar ist³⁶⁾.

³⁰⁾ A. v. Baeyer, A. **128**, 300 [1863]; s. a. W. Küster, H. **155**, 177—178 [1926].

³¹⁾ P. Haas, Soc. **91**, 1433 [1907]; s. ebenfalls W. Küster, H. **155**, 177 [1926].

³²⁾ Zu dieser Frage haben erst kürzlich A. Bach und A. Kultjugin, Bio. Z. **167**, 236 [1926], Stellung genommen.

³³⁾ B. **55**, 3601 [1922].

³⁴⁾ Die diesbezüglichen Versuche haben wir mit 15 mg $FeSO_4 + 7H_2O$ unter den im experimentellen Teil beschriebenen Bedingungen der Peroxydase-Bestimmung (Phosphat-Puffer, o^0) vorgenommen. In schwefelsaurer Lösung scheint Fe^{2+} nach den Versuchen von J. Brode, Ph. Ch. **37**, 257 [1901], eine echte, wenn auch nur sehr geringe, peroxydatische Katalyse zu bewirken.

³⁵⁾ vergl. J. Wolff und E. de Stoecklin, C. r. **156**, 1415 [1908].

³⁶⁾ R. Kuhn bei C. Oppenheimer: „Die Fermente“, Lfg. XII, 1745 [1926]; G. Thieme, Leipzig.

In ausgesprochen katalytischer Weise vermögen Ferro- und Ferrisalze H_2O_2 zu zersetzen, aber auch diese Wirkung ist eine sehr viel schwächere, als die der gleichen Eisenmenge im Hämin.

Die vorliegenden Beobachtungen machen es sehr unwahrscheinlich, daß die Leerreaktion zwischen Jodwasserstoff und Wasserstoffsperoxyd auf Spuren von Eisen-Ionen beruht. Es handelt sich auch nicht um eine Jod-Katalyse, wie sie O. Warburg³⁷⁾ für die Umsetzung von Oxalsäure mit Jodsäure nachgewiesen hat. Denn der Umsatz ist unabhängig davon, ob wir das ausgeschiedene Jod in dem Maße seiner Bildung fortlaufend mit Thio-sulfat umsetzen oder erst nach Ablauf einer längeren Zeit auf einmal titrieren.

Die katalytische Oxydation der Jodwasserstoffsäure, die durch Hämin, HbO_2 und in intensivster Weise durch echte Peroxydasen bewirkt wird, scheint sich nicht dem Rahmen der Dehydrierungs-Theorie³⁸⁾ zu fügen. Die Jodwasserstoffsäure ist in verdünnter wäßriger Lösung vollständig ionisiert, und man wird den Mechanismus der Peroxydase-Wirkung in einer Entladung der Jod-Ionen anstatt in einer Dehydrierung undissoziierter Jodwasserstoff-Moleküle zu suchen haben. Für die Annahme, es könnten dennoch solche Moleküle, wenn sie auch nur in sehr geringer Menge vorhanden sind, reaktionsvermittelnd auftreten, ergibt die Analyse der p_H -Kurve keine Stütze. Daß im System Hämin + Hydroperoxyd + Jodwasserstoff nicht nur der Acceptor, sondern auch das Hydroperoxyd an den Katalysator geht, ist aus der Katalase-Wirkung des Hämins zu schließen. Für die nicht katalatisch wirkenden, echten Peroxydasen wird derselbe Schluß, die Addition von Hydroperoxyd an den Katalysator, von R. Willstätter³⁹⁾ gezogen auf Grund der reversiblen Hemmung, die das Enzym bei steigender H_2O_2 -Konzentration erleidet⁴⁰⁾.

Quantitative Wirksamkeits-Vergleiche.

0.25×10^{-2} Mol. Ferrosalz im Liter zersetzen in schwefelsaurer Lösung bei p_H 1.7 und 40° in 15 Min. 25% von 0.01 Mol. H_2O_2 . Bei 0° und in 0.085 -molarer H_2O_2 -Lösung würden 0.23×10^{-4} Mol. Fe denselben prozentischen Umsatz in $(15 \times 100 \times 0.25 \times 10^{-2} \times 3.3^4) : (0.23 \times 10^{-4} \times 85) = 227000$ Min. bewirken⁴¹⁾. Unter eben diesen Bedingungen wird der gleiche Spaltungsgrad durch dieselbe Eisenmenge in Form von Hämin (3 mg) bei p_H 4–8 schon in 60 Min. erzielt. Hämin ist eine 3000–4000-mal stärkere Katalase als Ferro- bzw. Ferri-Ion⁴²⁾. Mit steigender Temperatur verringert sich allerdings der Unterschied, da der Temperatur-Koeffizient für Fe-Ion 3.3, für Hämin aber nur 1.05 beträgt.

1 Fe-Ion zersetzt unter den angegebenen Bedingungen 0.03 Mol. Hydroperoxyd, 1 Mol. Hämin 90–100 Mol. pro Stunde. Peroxydatisch werden in der gleichen Zeit etwa 30 Mol. H_2O_2 pro Hämin-Molekül umgesetzt. Zum Vergleich führen wir an, daß 1 Saccharase-Teilchen, wenn die von

³⁷⁾ Bio. Z. **174**, 497 [1926].

³⁸⁾ H. Wieland, *Ergebn. d. Physiol.* **20**, 477 [1922].

³⁹⁾ „Über Sauerstoff-Übertragung in der lebenden Zelle“, B. **59**, 1871 [1926].

⁴⁰⁾ R. Willstätter und H. Weber, VI. Abhandl. über Peroxydase, A. (im Druck).

⁴¹⁾ Die Daten für die Umrechnung sind der Arbeit von St. Bertalan, *Ph. Ch.* **95**, 328 [1920], entnommen.

⁴²⁾ Über die Koexistenz von Eisen(II)- und Eisen(III)-salz mit Hydroperoxyd vergl. J. Brode, *Ph. Ch.* **37**, 257 [1901].

H. v. Euler⁴³⁾ angenommene Molekulargröße von 20000 für reines Enzym von Jf 450 der Berechnung zugrunde gelegt wird, bei p_H^0 und optimalem p_H etwa 700000 Rohrzucker-Moleküle in 60 Min. spaltet. Die Vergleichszahl für Enzymwirkung versucht, nur schätzungsweise die Größenordnung der Wirksamkeit zu veranschaulichen.

Beschreibung der Versuche.

In den folgenden Tabellen geben die Maßzahlen für Peroxydase-Wirkung ccm $n/_{10}$ -Thio-sulfat an, die bei Titration unter Zusatz von Stärke für die ausgeschiedene Jod-Menge verbraucht wurden. Es kommt nicht darauf an, ob mehrmals in der Minute in dem Maße als Jod-Bildung stattfindet, titriert wird oder aber erst nach 1 Stde. auf einmal. Eine Ausnahme bildet das HbO_2 , bei dem starke Jod-Schädigung eintritt⁴⁴⁾. Für die Katalase-Versuche geben wir ccm $n/_{10}$ - $KMnO_4$ an. Nur in besonderen Fällen wurde die H_2O_2 -Abnahme jodometrisch unter Zusatz von Molybdänsäure bestimmt⁴⁵⁾. Die Hydroperoxyd-Lösungen wurden aus Merckschem zusatz-freiem Perhydrol bereitet.

Hydroperoxyd-Jodwasserstoff-Reaktion ohne Katalysator.

p_H -Kurve (Fig. 2).

20 ccm 0.17-n. H_2O_2 + 10 ccm 0.42-n. KJ + 20 ccm $m/_{5}$ -Phosphat-Puffer zu 200 ccm; $H_2O_2 = 0.017$, KJ = 0.021; p_H^0 . In Fig. 2 sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen angegeben. p_H -Werte ohne H_2O_2 bei 23° elektrometrisch bestimmt.

Zeit (Min.)	p_H	p_H	p_H	p_H	p_H	p_H
	2.12	2.35	5.72	6.88	7.30	7.93
10	0.98	0.83	0.76	0.78	0.72	(0.09)
20	1.82	1.59	1.46	1.50	1.22	(0.15)
30	2.62	2.29	2.12	2.17	1.89	(0.18)
40	3.41	3.02	2.77	2.80	2.39	(0.23)
50	4.12	3.69	3.44	3.45	2.90	(0.26)
60	4.80	4.34	4.13	4.06	3.39	(0.29)

Bei Anwendung von 20 ccm $m/_{5}$ -Acetat an Stelle der Phosphat-Gemische waren die Reaktionsgeschwindigkeiten ein wenig größer. Bei p_H 5.72 (Phosphat-Gemisch) ergab sich im Bereich 1:16 bzw. 1:8 genaue Proportionalität zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Hydroperoxyd- bzw. Kaliumjodid-Konzentration. Unsere Leerversuche stehen in ausgezeichneter Übereinstimmung mit den exakten kinetischen Messungen von A. A. Noyes⁴⁶⁾.

Hydroperoxyd-Zersetzung durch Jod-Ion.

Für diese namentlich von J. Walton⁴⁷⁾ untersuchte Katalyse hat sich die in Fig. 1 dargestellte p_H -Abhängigkeit ergeben.

20 ccm 0.175-n. H_2O_2 + 10 ccm 0.42-n. KJ + 20 ccm $m/_{5}$ -Phosphat; Reaktionsdauer je 60 Min. bei p_H^0 . Jodometrische Bestimmungen unter Zusatz von MoO_3 .

p_H	4.6	6.37	6.80	6.90	6.98	7.1	7.5	8.1
ccm $n/_{10}$ -J .	0.10	0.70	1.92	2.12	3.50	3.24	5.12	7.72.

⁴³⁾ vergl. H. v. Euler, B. **55**, 3583 [1922].

⁴⁴⁾ J. Wolff, Ann. Inst. Pasteur **25**, 313 [1911].

⁴⁵⁾ F. P. Treadwell, Lehrb. d. analyt. Chem., Bd. II, 580 [1923].

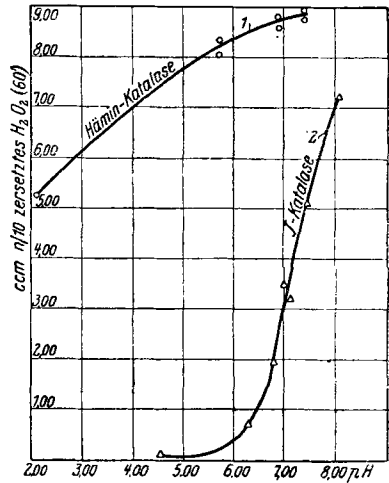
⁴⁶⁾ Ph. Ch. **18**, 131 [1895]. ⁴⁷⁾ Ph. Ch. **47**, 195 [1904].

Ohne Puffer entsprach die H_2O_2 -Zersetzung 6.72 ccm, bei Verdopplung der KJ-Konzentration 13.88 ccm $n/10$ -Jod.

Die Katalase-Wirkung des Hämins

ist nur mit einer Genauigkeit von ± 0.2 ccm $n/10$ - $KMnO_4$ anzugeben, da das Hämin, auch wenn schon Entfärbung stattgefunden hat, noch langsam mit Permanganat reagiert. Man titriert am besten, bis ein kräftiger rosa Farbton etwa $1/2$ Min. bestehen bleibt. Unter diesen Bedingungen verbraucht 1 mg Hämin 0.53 ccm $n/10$ - $KMnO_4$, was bei allen folgenden Werten berücksichtigt ist. Das verwandte Hämin war nach der Vorschrift von Nencki-Zaleski⁴⁸⁾ dargestellt worden; 1 g des Farbstoffes wird in 1 l $m/50$ - $Na_2HPO_4 + 2H_2O$ gelöst; diese Lösung wird im Folgenden stets als „Hämin“ bezeichnet; inwieweit bei der Auflösung eine Umwandlung in „Hämatin“ statthat, bleibe dahingestellt. Zur Kontrolle des selbst dargestellten Präparates verwandten wir Hämin, das uns Hr. Geheimrat Willstätter in freundlichster Weise zur Verfügung gestellt hatte. Dieses stimmte mit unserem Präparat genau überein.

Fig. 1.
Hämin- und J'-Katalase-Wirkung.



- 1. 3 mg Hämin = 0.000023 m
- 2. 700 mg KJ = 0.021 m

Aciditäts-Funktion (Fig. 1).

20 ccm 0.17-n. $H_2O_2 + 20$ ccm $m/5$ -Phosphat + 3 mg Hämin = 0.264 mg Fe zu 200 ccm; Reaktionsdauer 60 Min. bei 0°.

PH ⁴⁹⁾	2.12	5.72	6.88	7.93
ccm $n/10$ - $KMnO_4$..	5.22 ⁵⁰⁾	8.55	9.09	9.27
		8.80	9.25	9.42.

Versuchsbedingungen	PH	Hämin (mg)	Zeit (Min.)	ccm $n/10$ - $KMnO_4$	
wie oben bei PH 5.72					
3 mg Hämin	8.80	7.93	3	60	9.42
6 mg „	17.17	7.93	6	30	12.68
9 mg „	23.77	7.93	9	20	14.43

Abhängigkeit von der Hämin-Menge.

Bei Konstanz des Produktes Hämin-Menge×Zeit ist der Umsatz am größten bei kleinster Versuchsdauer. Wird das Produkt Hydroperoxyd-Menge×Zeit konstant gehalten, so wird ebenfalls bei kürzester Reaktionszeit der größte Umsatz erzielt.

⁴⁸⁾ H. 30, 390 [1900].

⁴⁹⁾ Bei 25° mit Hämin, aber ohne H_2O_2 elektrometrisch gemessen.

⁵⁰⁾ Während des Versuchs flockte Hämatin aus.

Je 3 mg Hämin mit 20 ccm $m/5$ -Phosphat zu 200 ccm; 0° ; p_H 7.93.
 10 ccm 0.17-n. H_2O_2 120 Min. 8.76 ccm $n/10$ - $KMnO_4$
 20 ccm „ 60 „ 9.42 ccm „
 40 ccm „ 30 „ 10.12 ccm „

Von der Verdünnung hängt die Hämin-Katalase nicht nennenswert ab. Mit 20 ccm H_2O_2 ergaben sich z. B. bei 100 ccm Gesamtvolumen 9.48 ccm, bei 200 ccm 9.42 ccm Abnahme des Permanganat-Verbrauches bei p_H 7.93, 0° und 60 Min. Reaktionsdauer.

Kinetik.

100 ccm 0.170-n. H_2O_2 + 100 ccm $m/6$ -Phosphat + 15 mg Hämin zu 1000 ccm; p_H 7.93; 0° . Zur Titration je 50 ccm entnommen.

Zeit (Min.)	ccm $n/10$ - $KMnO_4$		Umsatz (%)	$k = \frac{10^4}{t-10} \log_{10} \frac{7.98}{x}$
	Verbrauch (x)	Abnahme		
0	8.90	—	—	—
10	7.98	0.92	10.3	—
20	7.60	1.30	14.6	21.2
30	7.20	1.70	19.1	22.3
40	6.88	2.02	22.7	21.5
50	6.58	2.32	26.1	20.9
60	6.38	2.52	28.3	19.5
90	5.72	3.18	35.8	18.1
120	5.01	3.89	43.7	18.4
180	4.28	4.62	51.9	15.9
300	2.70	6.20	69.6	16.2
420	2.06	6.84	76.8	16.8

Die Reaktionskonstanten sind mit Rücksicht auf die abnorm hohe Anfangsgeschwindigkeit, die wir wiederholt bestätigt fanden, unter Vernachlässigung des ersten Reaktionsintervalls berechnet. Aber auch so sinkt k um etwa 20%, entsprechend der durch Kontrollversuche festgestellten Schädigung des Katalysators, die etwa 13% in der gleichen Zeit beträgt.

Beispiel für H_2O_2 -Schädigung: 3 mg Hämin blieben mit 20 ccm 0.17-n. H_2O_2 und 20 ccm $m/5$ - KH_2PO_4 und 150 ccm H_2O 1 Stde. stehen, wobei 25.3% H_2O_2 zersetzt wurden. Ein Parallelversuch (II) wurde nach dieser Zeit mit 10 ccm 0.42-n. KJ versetzt. Ein weiterer Versuch (III) wurde mit 3 mg Hämin und 20 ccm Phosphat, aber mit nur 14.9 ccm H_2O_2 angesetzt. IV war Leerversuch zu III. Nach 60 Min. verbrauchte II 4.50, III 4.76, IV 2.76 ccm $n/10$ -Thio-sulfat. Durch die Vorbehandlung mit H_2O_2 war die Peroxydase-Wirkung von 1.96 auf 1.72 zurückgegangen.

Temperatur-Koeffizient.

3 mg Hämin je 30 Min. bei p_H 6.88.
 0° 6.86 10° 7.22 20° 7.48 30° 7.88 ccm $n/10$ - $KMnO_4$.

Hemmung durch Blausäure.

3 mg Hämin, Normalbedingungen, Reaktionsdauer 1 Stde.

Je nach dem p_H (5.7—7.9) hemmen:

5 mg KCN 6—14% Fe: KCN = 1: 16.7
 50 mg „ 13—32% „ : „ = 1: 167
 500 mg „ 49—61% „ : „ = 1: 1670

Kaliumpyrophosphat (500 mg), das nach O. Warburg und O. Meyerhof Eisen-Katalysen spezifisch hemmt, war ohne Wirkung. Stark gehemmt wird die Katalase durch Kaliumjodid. 700 mg setzen den Umsatz von 8.80 auf 4.40 herab.

Wir ermittelten zunächst bei p_H 5.72 das in 60 Min. peroxydatisch ausgeschiedene Jod (6.30), fügten überschüssiges KJ zu und säuerten mit Schwefelsäure stark an. Durch Zusatz von Molybdänsäure gelang es sehr rasch, die Jod-Ausscheidung zu vervollständigen und so das noch unveränderte H_2O_2 zu bestimmen (24.40 n_{10} -Jod). Da zu Beginn 35.10 ccm n_{10} - H_2O_2 vorhanden waren, sind 4.40 ccm katalatisch verbraucht. Die Summe von Katalase- und Peroxydase-Umsatz beträgt 10.70 ccm — 4.00 ccm (Leerverbrauch) = 6.70 ccm⁵¹), während die Katalase-Wirkung in Abwesenheit von KJ 8.80 ccm entspricht.

Die Wirksamkeit der Hämin-Katalase finden wir unter Atmosphärendruck und bei 15 mm gleich groß im Gegensatz zur Leber-Katalase, die nach H. Wieland und H. Hausmann⁵²) durch Entzug der Gasbelastung irreversibel gehemmt wird.

Für die Belichtungsversuche diente eine 600-kerzige N_2 -gefüllte Halbwatt-Lampe, die aus 3 cm Entfernung das kugelige 250 ccm Reaktionsgefäß aus Jenaer Glas während der 1-stdg. Reaktionsdauer bestrahlte. Eine nennenswerte Beschleunigung des H_2O_2 -Zerfalls wurde nicht erreicht, wohl aber verblaßte die Farbe des Hämins fast gänzlich, während der Kontrollversuch im Dunkeln keine Farbaufhellung erkennen ließ.

Peroxydase-Wirkung des Hämins.

p_H -Kurve (Fig. 2).

3 mg Hämin + 20 ccm $m/5$ -Phosphat-Gemisch + 10 ccm 0.42-n. KJ + 20 ccm 0.17-n. H_2O_2 zu 200 ccm; 0⁰. Differenzen Hauptversuch-Leerversuch in ccm n_{10} -Thio-sulfat.

Zeit (Min.)	p_H	p_H	p_H	p_H	p_H	p_H	p_H	p_H	p_H	p_H
	2.12	2.35	2.90	5.06	5.72	6.00	6.41	6.88	7.30	7.91
10	0.03	0.13	0.15	0.48	0.62	0.60	0.60	0.29	0.23	0.05
20	0.11	0.21	0.31	0.95	1.06	0.86	0.76	0.56	0.36	0.09
30	0.16	0.32	0.35	1.41	1.43	1.27	1.03	0.72	0.48	0.13
40	0.21	0.34	0.41	1.68	1.79	1.55	1.23	0.82	0.59	0.15
50	0.33	0.44	0.50	1.98	2.01	1.78	1.33	0.95	0.59	0.17
60	0.49	0.51	0.58	2.05	2.19	1.90	1.42	1.08	0.67	0.21

Wie bei der Leer-Reaktion sind die Reaktionsgeschwindigkeiten mit $m/5$ -Acetat-Gemischen an Stelle der Phosphat-Puffer größer.

Zeit (Min.)	p_H	p_H	p_H
	3.57	4.26	4.46
10	0.73	0.80	0.85
15	1.00	1.16	1.21.

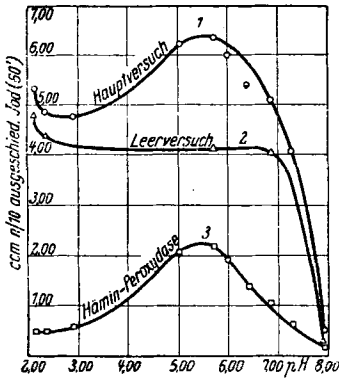
Während der 1-stdg. Versuchsdauer war selbst in den sauersten Lösungen nur geringe Trübung zu bemerken. Nach 24-stdg. Stehen war bei den Versuchen von $p_H \leq 2.9$ alles Hämin als Hämatin ausgefallen und

⁵¹) Dies ist ein Mindestwert, da die katalatische H_2O_2 -Verminderung auch die Peroxydase-Leerreaktion herabsetzt, die hier ganz in Rechnung gesetzt ist.

⁵²) A. 445, 181 [1925].

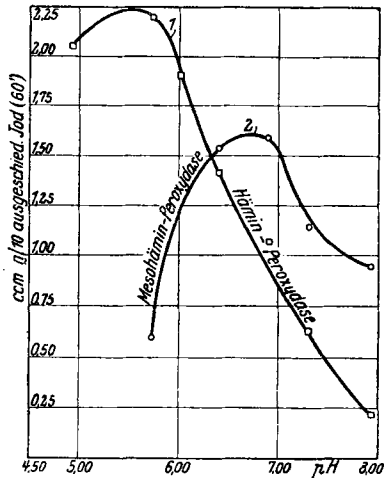
die überstehende Lösung farblos. Bei p_H 5.06 fand teilweise, bei p_H 5.72 spurenweise, in den alkalischeren Lösungen keine Flockung statt.

Fig. 2.
Peroxydase-Wirkung des Hämins.



1. Hauptversuch
2. Leerversuch
3. Beschleunigung durch 3 mg Hämin

Fig. 3.
Hämin- und Meso-hämin-
Peroxydase-Wirkung.



1. 3 mg Hämin
2. 3 mg Meso-hämin

Hämin-Konzentration und Reaktionsgeschwindigkeit (bei p_H 6.88).

30 Min.: 1.5 mg Hämin 0.33, 3 mg Hämin 0.72, 6 mg Hämin 1.39,
60 „ : 1.5 mg „ 0.53, 3 mg „ 1.08, 6 mg „ 1.84.

Abhängigkeit vom Hydroperoxyd mit je 3 mg Hämin (bei p_H 5.70).

Zeit (Min.)	10 ccm	20 ccm	40 ccm	80 ccm	160 ccm	0.17-n. H_2O_2
5	0.26	0.36	0.46	0.78	1.26	
15	0.67	1.04	1.47	2.02	2.52	
30	1.28	1.81	2.46	2.67	2.63	
60	2.05	2.88	3.33	3.07	1.62	

Die letzte Spalte zeigt, wie sehr mit steigender Hydroperoxyd-Konzentration die Schädigung des Katalysators zunimmt.

Einfluß der Jod-Ionen-Konzentration (3 mg Hämin, p_H 5.7).

Zeit (Min.)	2.5 ccm	5 ccm	10 ccm	20 ccm	0.42-n. Jodkalium
5	0.26	0.32	0.36	0.44	
15	0.60	0.86	1.04	1.11	
30	1.12	1.47	1.81	1.97	
60	1.70	2.42	2.88	2.78	

Während die Leer-Reaktion der Jodid-Menge genau proportional ist, wird hier durch die Verachtfachung der Jod-Ionen-Konzentration die Hämin-Wirkung noch nicht verdoppelt. Bei Halbierung des Reaktionsvolumens tritt anfangs wie bei der nicht katalysierten Reaktion Verdopplung der Reaktionsgeschwindigkeit zutage. Bei längerer Versuchsdauer sinkt durch

Hämin-Zerstörung die Reaktionsgeschwindigkeit im Versuch mit der höheren Konzentration rascher.

Min.	100 ccm	200 ccm	Reaktions-Volumen
10	1.28		0.62
20	2.04		1.17
30	2.61		1.58

Das Zeitgesetz der Hämin-Peroxydase ist, wie zu erwarten, sehr verwickelt, ihr Temperatur-Koeffizient oberhalb von 10° negativ. Bei 20° erlischt die Wirkung.

Min.	0°	10°	20°
10	0.57	0.98	0.08
20	1.17	1.34	0.03
30	1.58	1.56	0.07

Meso-hämin.

Das verwandte Präparat wurde aus Meso-porphyrin nach der Vorschrift von J. Zaleski⁵³⁾ hergestellt. Ein Kontrollpräparat reinsten krystallisierten Meso-hämins verdanken wir der Freundlichkeit von Hrn. Geheimrat Hans Fischer, dem wir an dieser Stelle unseren verbindlichsten Dank aussprechen.

Auf Katalase-Wirkung wurde bei p_H 5.72 und 8.0 mit negativem Ergebnis geprüft. In alkalischer Lösung trat starke Verblässung ein (Gegensatz zu Hämin).

p_H-Abhängigkeit der Peroxydase-Wirkung (Fig. 3).

3 mg Meso-hämin + 20 ccm m/6-Phosphat + 10 ccm Kaliumjodid + 20 ccm 0.17-n. H₂O₂ zu 200 ccm; 0°. Alle Lösungen des etwas schwerer als Hämin löslichen Meso-hämins waren noch lange über die Versuchsdauer hinaus vollkommen klar; p_H 7.3 verblaßt, p_H 7.93 entfärbt.

Zeit (Min.)	p _H	p _H	p _H	p _H	p _H
	5.72	6.41	6.88	7.30	7.93
10	0.02	0.89	0.64	0.42	0.43
20	0.11	1.04	0.91	0.62	0.69
30	0.21	1.11	1.04	0.69	0.89
40	0.29	1.30	1.30	0.89	0.93
50	0.40	1.44	1.51	1.09	0.95
60	0.60	1.54	1.60	1.14	0.96

Oxy-hämoglobin (Fig. 4).

Es wurden verschiedene, nach R. Willstätter und A. Madinaveitia¹²⁾ aus Pferdeblut dargestellte, wiederholt umkrystallisierte Präparate angewandt, die keine Spur von Katalase-Wirkung zeigten.

p_H-Kurve.

20 ccm 0.17-n. H₂O₂ + 10 ccm 0.42-n. KJ + Oxy-hämoglobin, entspr. rund 0.18 mg Fe + 20 ccm m/6-Puffer; 0°. Differenzen Hauptversuch-Leerversuch in ccm n/10-Thio-sulfat nach 60 Min.

p _H	2.12	2.35	3.50 ⁵⁴⁾	4.10 ⁵⁴⁾	4.40 ⁵⁴⁾	4.90	5.10	5.10	5.10
	1.65	0.69	0.44	0.78	1.60	3.70	3.65	3.74	3.40
	1.65	0.82	—	—	—	—	3.56	3.77	—
p _H	5.60	6.10	6.40	6.81	7.05	7.31	8.30		
	3.95	4.01	3.78	2.13	1.30	0.90	0.01		
	4.10	—	3.97	2.04	—	—	0.03		

⁵³⁾ H. 43, II.

⁵⁴⁾ Acetat-Puffer, sonst immer Phosphat-Puffer.

Nur an ein und demselben Tage gemachte Bestimmungen waren gut reproduzierbar. In allen Versuchen fielen braune Flocken aus, die anscheinend unter der Einwirkung des Jods aus dem Blutfarbstoff entstehen. Während bei optimalem p_{H1} in 1 Stde. insgesamt 8.0 ccm $n/10$ -Jod freigemacht wurden, wurde bei fortlaufender Titration ein mehr als 3-facher Umsatz (25.73 ccm) erhalten. Es soll geprüft werden, ob die p_{H1} -Kurve bei Vermeidung der Jod-Schädigung dieselbe bleibt.

Fig. 4.

Peroxydase-Wirkung des Oxy-hämoglobins
(HJ + H₂O₂).

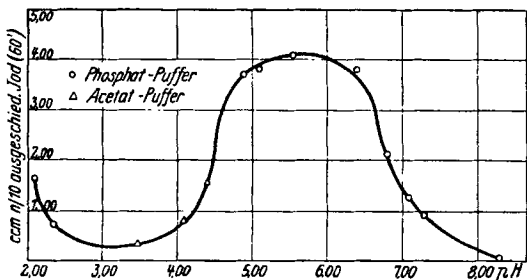
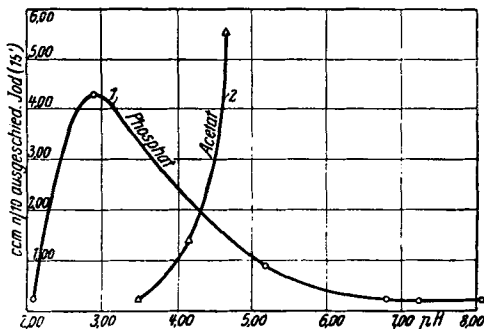


Fig. 5.

Meerrettich-Peroxydase-p_H-Kurve.



1. Phosphat-Puffer. 2. Acetat-Puffer.

Auch mit Pyrogallol als Acceptor ist keine einfache Beziehung zwischen Wirkungs-Optimum und isoelektrischem Punkt des HbO₂ zu erkennen. Das Optimum scheint wie bei der Jodwasserstoff-Reaktion zwischen p_{H1} 5 und p_H 6 zu liegen. Die Schärfe der Bestimmung⁵⁵⁾ leidet unter der Änderung des Farbtons der Oxydationsprodukte mit der Acidität, die nennenswerte Abweichungen vom Beerschen Gesetz bedingt.

5 g Pyrogallol + 20 ccm $m/6$ -Phosphat + 20 ccm 0.17-n. H₂O₂ + 60 mg frisches Oxy-hämoglobin (3. Krystallisation) zu 200 ccm; 0°. Reaktionsdauer 60 Min. Die Unterbrechung der Farbstoffbildung durch die vorgeschriebene Menge Schwefelsäure ist unvollkommen. Man muß möglichst rasch ausäthern.

pH	2.12	5.20	6.80	8.30
Schichtdicken im Colorimeter	70	50	58	64
Relative Wirksamkeit	71	100	86	78

Peroxydase aus Meerrettich (Fig. 5).

Es stand zur Verfügung ein Präparat von der Purpyrogallin-Zahl 540, das uns Hr. Geheimrat R. Willstätter, dem wir sehr zu Dank verpflichtet sind, in freundlichster Weise überlassen hatte. Bei Verwendung von Phosphat-Puffern fällt das Wirkungs-Optimum (p_H = etwa 3) mit dem Minimum der HbO₂-Wirkung (Fig. 5) zusammen. Weit mehr als beim Blutfarbstoff, macht sich jedoch die Neutralsalz-Wirkung geltend.

0.90 mg Peroxydase + 20 ccm 0.17-n. H₂O₂ + 20 ccm $m/6$ -Phosphat bzw. -Acetat + 10 ccm 0.42-n. Kaliumjodid zu 200 ccm; 0°. Titration mit Thio-sulfat fortlaufend ausgeführt.

⁵⁵⁾ Ausgeführt nach R. Willstätter und A. Pollinger, H. 130, 281 [1923].

Zeit (Min.)	p _H	p _H	p _H	p _H	p _H	p _H	p _H	p _H	p _H
	2.12	2.9	3.5 ⁶⁶⁾	4.2 ⁶⁶⁾	4.6 ⁶⁶⁾	5.2	6.8	7.25	8.1
5	0.21	2.35	0.15	0.73	2.94	0.73	0.16	0.10	0.10
10	0.22	3.40	0.21	1.04	4.37	0.80	0.17	0.17	0.21
15	0.29	4.30	0.23	1.46	5.55	0.91	0.25	0.22	0.21

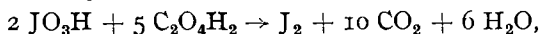
379. F. Gottwalt Fischer und Carl Wagner:

Die Oxydations-Wirkung der Jodsäure und ihre Hemmung.

[Aus d. Chem. Laborat. d. Bayr. Akademie d. Wissenschaften zu München.]

(Eingegangen am 10. September 1926.)

Als Beitrag zu der Frage nach dem Wesen der Hemmung chemischer Reaktionen durch Blausäure ist die von E. Millon¹⁾ beobachtete Oxydation von Oxalsäure durch Jodsäure:



welche durch eine sehr geringe Blausäure-Konzentration verhindert wird, in neuester Zeit von H. Wieland und F. G. Fischer²⁾, sowie von O. Warburg und S. Toda³⁾ eingehender untersucht worden.

Wieland und Fischer fanden, daß die Reaktionsgeschwindigkeit von Lösungen der reinen Handelspräparate (10 ccm $n/2$ -HJO₃ + 5 ccm n -C₂O₄H₂ bei 80°) durch Zusatz von Ferri-Ionen nicht erhöht wird, und daß sie gleich der von sorgfältig gereinigten Präparaten ist, in denen kein Eisen nachgewiesen werden konnte. Halogen-Ionen (Cl' und Br') katalysieren die Reaktion stark positiv; $n/500$ -Blausäure hemmt sie völlig. Durch Evakuieren der Lösung läßt sich diese Hemmung beseitigen, jedoch nicht durch Zugabe eines Überschusses an Eisensalz.

Warburg und Toda dagegen geben an, daß Eisensalze die Reaktion beschleunigen, und daß bei 19° im Anfangsstadium des Umsatzes die Reaktionsgeschwindigkeit durch sorgfältige Reinigung der Präparate auf den zehnten Teil sinkt. Durch Zugabe von 10⁻³ mg Eisen in Form von „Eisensulfat“ (es ist nicht angegeben, ob Eisen(II)- oder Eisen(III)-sulfat) wird die Reaktionsgeschwindigkeit der ungereinigten Säuren wieder hergestellt. Toda schließt u. a. aus seinen Versuchen: „1. Mindestens 90% des Umsatzes, den ich in ungereinigten Jodsäure-Oxalsäure-Lösungen fand, war durch katalytische Wirkung von Eisen hervorgerufen. 2. Mindestens 90% der Blausäure-Wirkung, die ich bei Zugabe von Blausäure zu ungereinigten Jodsäure-Oxalsäure-Gemischen beobachtete, beruht auf einer Reaktion der Blausäure mit Eisen“.

Da die Versuche von Wieland und Fischer eine Eisen-Katalyse ausschließen⁴⁾, ist die Jodsäure-Oxalsäure-Umsetzung zur weiteren Klärung abermals untersucht worden. Einige Abhandlungen von G. Lemoine⁵⁾, die bisher übersehen worden waren, brachten eine erwünschte Ergänzung.

⁶⁶⁾ Acetat-Puffer; bzgl. der p_H-Kurve der pflanzlichen Peroxydase s. a. E. Abel, Z. El. Ch. **28**, 489 [1922].

¹⁾ C. r. **19**, 270 [1844]. ²⁾ B. **59**, 1171 [1926].

³⁾ Naturwiss. **13**, 442 [1925]; S. Toda, Bio. Z. **171**, 231 [1926].

⁴⁾ In einer nach Abschluß unserer Versuche veröffentlichten Notiz (Bio. Z. **174**, 497 [1926]) erkennt Warburg selbst die Unrichtigkeit der Schlüsse von Toda.

⁵⁾ C. r. **171**, 1094 [1920], **173**, 7, 192 [1921].