

10. A. Bach und D. Michlin: Enzymatische Umwandlung des Xanthins und Hypoxanthins in Harnsäure ohne Mitwirkung fremder Wasserstoff-Acceptoren.

[Aus d. Biochem. Institut d. Kommissariats für Volks-Gesundheit in Moskau.]

(Eingegangen am 12. November 1926.)

Von A. Bach¹⁾ ist festgestellt worden, daß die bekannte Fähigkeit tierischer Gewebe, Farbstoffe zu Leukobasen und Nitrate zu Nitriten zu reduzieren, auf der Zusammenwirkung eines Enzyms und eines Koenzyms beruht, die getrennt keine reduzierende Wirkung ausüben. Ersteres ist mit dem von Schardinger²⁾ in roher Milch entdeckten Enzym, welches Methylenblau und Nitrate in Gegenwart von Aldehyden reduziert, identisch. Das Koenzym, welches den Organ-Geweben durch kochendes Wasser entzogen werden kann und ein Gemisch von Protein-Abbauprodukten darstellt, ersetzt Aldehyde bei der Schardinger-Reaktion und wird seinerseits bei der Wirkung des Organ-Enzyms durch Aldehyde ersetzt.

E. J. Morgan, C. P. Stewart und F. G. Hopkins³⁾ bestätigten Bachs Befund und erweiterten ihn durch die wichtige Beobachtung, daß die Reduktion des Methylenblaus unter dem Einflusse des Schardinger-Enzyms auch dann erfolgt, wenn Hypoxanthin und Xanthin an Stelle der Aldehyde angewandt werden. Die Basen werden dabei zu Harnsäure „anaerob“ oxydiert. Dieselben Forscher fanden weiter, daß bei der Oxydation der Basen nicht nur Methylenblau, sondern auch freier Sauerstoff als Wasserstoff-Acceptor fungieren kann, daß also das Schardinger-Enzym sich auch als direkte Oxydase verhält. Dabei ergab sich, daß der Sauerstoff-Verbrauch (im Barcroftschem Mikro-respirometer gemessen) der für die Oxydation der Basen erforderlichen Sauerstoff-Menge entsprach. Von Dixon und Thurlow⁴⁾, die das Gebiet weiter bearbeiten, wird nunmehr das Schardinger-Enzym als Xanthin-Oxydase angesprochen.

Daß das in roher Milch anwesende Enzym bei der Einwirkung auf Salicylaldehyd mehr Salicylsäure in Gegenwart von Sauerstoff als bei Sauerstoff-Abschluß liefert, wurde von H. Wieland⁵⁾ festgestellt und für die Unterstützung seiner Ansichten über das Wesen der Oxydations-Vorgänge ausgewertet. Bach und Nikolajew⁶⁾ zeigten aber vor kurzem, daß das nach Sbarsky und Michlin⁷⁾ isolierte und gereinigte Milch-Enzym gerade das entgegengesetzte Verhalten aufweist: es ergibt mehr Salicylsäure in Abwesenheit von Sauerstoff, als bei Sauerstoff-Zutritt. Das isolierte Schardinger-Enzym behält also seine Fähigkeit, die Cannizzarosche Umlagerung zweier Aldehyd-Moleküle auf Kosten des Wassers auszulösen, nicht aber molekularen Sauerstoff auf Aldehyde zu übertragen.

Mit Rücksicht auf diese Ergebnisse war es von Interesse zu ermitteln, ob das gereinigte Milch-Enzym imstande ist, auch die Purin-Basen ohne Mitwirkung fremder Wasserstoff-Acceptoren in Harnsäure

¹⁾ Biochem. Ztschr. **31**, 443 [1911], **38**, 154 [1912].

²⁾ Ztschr. Unters. Nahr.- u. Genußm. **5**, 22 [1902].

³⁾ Proceed. Royal Soc. **94**, 109 [1922]. ⁴⁾ Biochem. Journ. **18**, 971 [1924].

⁵⁾ B. **46**, 3327 [1913]. ⁶⁾ Biochem. Ztschr. **169**, 105 [1926].

⁷⁾ Biochem. Ztschr. **155**, 486 [1925], **174**, 116 [1926].

umzuwandeln, also eine der Dismutation der Aldehyde analoge Umlagerung der Basen zu bewirken. Wegen der gewissen Ähnlichkeit der HCO- und HCN-Gruppen, die bei der Oxydation in OC.OH und OC.NH übergehen, war die Möglichkeit einer derartigen Umlagerung nicht ausgeschlossen. Wie aus Nachstehendem ersichtlich, hat sich diese Voraussetzung bestätigt.

Beschreibung der Versuche.

Das von uns angewandte, völlig wasser-lösliche Enzym-Präparat wurde nach Sbarsky und Michlin durch Fällen von Buttermilch mit Aceton, Entfetten, Extraktion der Fällung mit 0.005-n. Salzsäure, Adsorption an Kaolin und Elution dargestellt. Seine Wirksamkeit, an der Reduktion von Nitrat zu Nitrit in Gegenwart von Acetaldehyd gemessen, betrug etwa das 260-fache der Wirksamkeit frischer Milch (auf Trocken-substanz bezogen). Für sich allein übte das Enzym-Präparat weder auf Methylenblau, noch auf Natriumnitrat die mindeste reduzierende Wirkung aus. Es war daher frei von irgendeinem Hydroxyl-Acceptor.

15 mg Xanthin wurden in 10 ccm 0.1-n. Natronlauge gelöst, mit 0.1-n. Monokaliumphosphat-Lösung auf $pH = 7.8$ neutralisiert, wobei ein Teil der Purinbase ansfiel, mit einer Lösung von 10 mg Enzym-Präparat in 5 ccm Wasser versetzt und mit Wasser auf 30 ccm gebracht. Das Gemisch wurde in 2 Portionen zu je 15 ccm verteilt. Im Thermostaten bei 60° wurde die eine mit einem reinen Luft-Strom behandelt, die andere in einer Atmosphäre reinen Stickstoffs stehen gelassen. Nach Verlauf von 6 Stdn. wurde jede Portion mit Wasser auf 90 ccm verdünnt, mit 5 ccm Natriumwolframat-Lösung und 5 ccm $\frac{2}{3}$ -n. Schwefelsäure nach Folin⁸⁾ gefällt und filtriert; im Filtrat wurde die gebildete Harnsäure mit Silberlactat ausgeschieden und colorimetrisch bestimmt.

Gebildete Harnsäure: Im Luft-Strom 1.5 mg, in Stickstoff-Atmosphäre 1.52 mg. Ein durch Erhitzen zum Kochen inaktiviertes Enzym-Präparat ergab keine Spur Harnsäure.

Mehrere weitere Versuche wurden in ähnlicher Weise mit Xanthin und Hypoxanthin ausgeführt. Das Ergebnis war, daß die Anwesenheit von Sauerstoff keinen Einfluß auf die Umwandlung der Purinbasen in Harnsäure auszuüben schien. Indessen war noch die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß der angewandte Stickstoff Spuren Sauerstoffs enthielt, die zur Oxydation der geringen Mengen der Purinbasen ausreichen konnten. Wir stellten daher Versuche mit größeren Ansätzen unter strengstem Sauerstoff-Abschluß an.

1. 0.160 g Hypoxanthin wurden in einem 50 ccm fassenden Meßkolben in 15 ccm 0.1-n. Natronlauge gelöst, mit der erforderlichen Menge Monokaliumphosphat-Lösung auf $pH = 7.8$ gebracht und mit 0.5 g Enzym-Präparat und Wasser bis zum Strich vermischt. Das Gemisch wurde zu je 25 ccm auf 2 mit Zu- und Ableitungs-Röhren und Hähnen versehene Kölbchen verteilt. Das zum Stickstoff-Versuch dienende Kölbchen wurde zunächst mit reinem, ausgekochtem Wasser aufgefüllt, das Wasser durch reinen Stickstoff verdrängt und nach Einführen der mit kleinen Mengen gepulverten Thymols versetzten Versuchsflüssigkeit dann zum Entfernen der letzten Spuren von Sauerstoff mehrmals evakuiert und mit Stickstoff gefüllt. Der Stickstoff aus der Bombe wurde durch eine auf 600° erhitzte, mit frisch reduzierten Kupfer-Spänen beschickte Porzellanröhre und dann durch 2 Waschflaschen mit stark alkalischer, konz. Pyrogallol-Lösung geleitet und in einem Glasbehälter über Phosphor in Stangen aufbewahrt. Als Sperrflüssigkeit diente reines, ausgekochtes Wasser. Beim Heraustreten aus dem Behälter passierte der auf diese Weise gereinigte Stickstoff noch eine unter sorgfältigem Sauerstoff-Abschluß mit alkali-

⁸⁾ Journ. biol. Chem. 38, 459 [1919].

schem Pyrogallol beschickte Waschflasche. Die schwach gelbe Färbung des Reagens blieb während der Dauer der Versuche völlig unverändert. Der angewandte Stickstoff war daher sauerstoff-frei.

Das auf diese Weise mit der Versuchsflüssigkeit in einer Stickstoff-Atmosphäre beschickte Kölbchen wurde bei geschlossenen Hähnen im Thermostaten 24 Stdn. bei 30° stehen gelassen. Das zweite Kölbchen wurde direkt mit der Versuchsflüssigkeit unter Thymol-Zusatz beschickt und gleichzeitig mit dem ersten im Thermostaten mit einem Luft-Strom behandelt. Nach Verlauf von 24 Stdn. wurde der Inhalt jedes Kölbchens, der aus einer klaren Flüssigkeit und einem weißen Bodensatz bestand, quantitativ unter Auflösen des letzteren in 0.1-n. Natronlauge in einen Meßkolben gebracht und die Harnsäure weiter nach Folin bestimmt.

Gebildete Harnsäure: Im Luft-Strom 0.010 g, in Stickstoff 0.011 g.

2. 0.200 g Hypoxanthin wurden in 20 ccm 0.1-n. Natronlauge gelöst, mit Monokaliumphosphat-Lösung auf $pH = 7.8$ neutralisiert, mit 0.5 g Enzym-Präparat und Thymol versetzt, mit Wasser auf 60 ccm gebracht und auf 2 Kölbchen, wie oben angegeben, verteilt. Dauer des Versuchs 6 Stdn., Temperatur 60°.

Gebildete Harnsäure: Im Luft-Strom 0.024 g, in Stickstoff 0.026 g.

Auf Grund dieser Versuche sind wir zu der Schlußfolgerung berechtigt, daß das Schardinger-Enzym imstande ist, Xanthin und Hypoxanthin ohne Mitwirkung anderer Wasserstoff-Acceptoren als die Purinbasen selbst zu Harnsäure zu oxydieren. Diese auf Kosten des Wassers erfolgende Oxydation setzt die gleichzeitige Bildung von Reduktionsprodukten der angewandten Basen voraus. Wir versäumten daher nicht, nach derartigen Reduktionsprodukten zu fahnden. Wegen der bekannten Labilität der letzteren⁹⁾ sind unsere Bemühungen bisher erfolglos geblieben. Die Versuche sollen mit größeren Ansätzen vorgenommen werden. Schon jetzt aber ist es klar, daß die von Hopkins und seinen Schülern beobachtete und gemessene Sauerstoff-Absorption bei der Einwirkung des Milch-Enzyms auf Xanthin und Hypoxanthin nicht in direkter Beziehung zu der Oxydation der Basen steht. Freier Sauerstoff ist für die Umwandlung der Purinbasen und der Aldehyde unter dem Einfluß des Milch-Enzyms völlig nutzlos oder sogar schädlich.

Vor 17 Jahren hat Bach¹⁰⁾ zuerst hervorgehoben, daß die von Schmiedeberg¹¹⁾ in der Leber aufgefundene, als Oxydase angesehene Salicylase keine Oxydase ist, sondern ein Enzym, welches die Cannizzarose Umlagerung des Salicylaldehyds beschleunigt. Er wies darauf hin, daß unter den Reaktionsprodukten neben Salicylsäure das entsprechende Reduktionsprodukt, Saligenin, auffindbar sein müßte. Diesem Fingerzeig folgend, haben Battelli und Stern¹²⁾ tatsächlich die Bildung von Saligenin bei der Einwirkung von Leber-Gewebe auf Salicylaldehyd festgestellt, ein Befund, der von Wieland⁵⁾ bestätigt worden ist. Nachdem die Salicylase der Gewebe sich als identisch mit dem Schardinger-Enzym erwiesen hat, werden letzterem wiederum oxydatische Eigenschaften zugeschrieben. Durch obige Versuche ist dieser Ansicht die experimentelle Grundlage entzogen worden.

Zum Schluß noch einige Bemerkungen über das Wesen und die Nomenklatur der oxydo-reduzierenden Enzyme.

Das Schardinger-Enzym ist ohne jede Wirkung auf molekularen Wasserstoff und trägt nur aktiven, bei der Spaltung des Wassers entstehenden Wasserstoff auf geeignete Substrate über. Es liegt hier eine ausgeprägte Analogie mit der Peroxydase vor, die ebenfalls auf molekularen

⁹⁾ J. Tafel, B. **34**, 1165 [1901]. ¹⁰⁾ Biochem. Ztrbl. **9**, 9 [1909] (Sammelreferat).

¹¹⁾ Arch. exp. Pathol. Pharmacol. **14**, 288 [1881]. ¹²⁾ Biochem. Ztschr. **29**, 130 [1910].

Sauerstoff ohne jede Wirkung ist und nur aktiven, peroxydischen Sauerstoff überträgt. In Anbetracht dieser Analogie hat Bach¹⁾ das Schardinger-Enzym mit dem Namen Perhydridase belegt. Dieser Name hat wenig Beifall gefunden, wahrscheinlich weil faßbare Perhydride nicht bekannt sind. In der letzten Auflage seines wertvollen Handbuches hat Oppenheimer¹³⁾ im Anschluß an die Wielandsche Dehydrierungs-Theorie die Bezeichnung Perhydridasen durch Dehydrasen ersetzt und das Schardinger-Enzym als Aldehydrase katalogisiert. Abgesehen davon, daß die allgemeine Gültigkeit der Wielandschen Theorie von verschiedenen Seiten (Bach, Warburg, Manchot, Traube, Willstätter) bestritten wird, ist der Name Aldehydrase an und für sich nicht einwandfrei, da er die Funktion des Enzyms einseitig darstellt: das Schardinger-Enzym ist nicht nur eine Aldehyd-Dehydrase, sondern auch eine Aldehyd-Hydrase. In theoretischer Hinsicht ist es nicht ohne Interesse hervorzuheben, daß gerade vom Standpunkt der Wielandschen Theorie in ihrem extremsten Sinne das Wesen des hier in Betracht kommenden Phänomens viel besser durch die Bezeichnung Perhydridase als durch Dehydrase umschrieben wird.

Nach Wieland bewirkt das Schardinger-Enzym eine Auflockerung, eine Aktivierung des Wasserstoffs der Substrat-Moleküle. Natürlich ist damit nicht gemeint, daß das Enzym aktiven Wasserstoff da schafft, wo kein aktiver Wasserstoff vorhanden ist, — das wäre mit der klassischen Definition der Katalyse unvereinbar. Das Enzym kann nur die Erreichung des Gleichgewichts-Zustandes zwischen einem Körper, der lockeren, aktiven Wasserstoff enthält, und einem anderen, der als Wasserstoff-Acceptor fungieren kann, beschleunigen. Nun ist ein Körper, welcher lockeren, aktiven Wasserstoff, also mehr Wasserstoff als er fest binden kann, enthält, nichts anderes als ein Perhydrid, in ähnlicher Weise, wie ein Körper, welcher lockeren, aktiven Sauerstoff enthält, als Peroxyd bezeichnet wird. Den modernen Anschauungen gemäß, beteiligen sich an einer chemischen Reaktion nicht sämtliche anwesende Moleküle, sondern nur aktive, angeregte, in vorliegendem Falle nur „perhydridisch“ angeregte, Moleküle. Nur mit diesen Perhydriden reagiert das Enzym; es stört, indem es ihnen den aktiven Wasserstoff entzieht und auf geeignete Substrate überträgt, das Gleichgewicht zwischen aktiven und nicht aktiven Molekülen und bedingt das Fortschreiten der Reaktion. Das Enzym verhält sich hier als eine echte Perhydridase. Gegen diese Bezeichnung hat Oppenheimer¹⁴⁾ eingewendet, daß die Perhydridase selbst ein Perhydrid ist. Das ist richtig, aber nur insofern, als das Enzym zum Perhydrid wird, wenn es perhydridischen Wasserstoff aufnimmt in ähnlicher Weise, wie die Peroxydase zum Peroxyd wird, wenn sie peroxydischen Sauerstoff aufnimmt. An und für sich ist die Perhydridase ebensowenig ein Perhydrid, wie die Peroxydase ein Peroxyd. Die Analogie zwischen beiden Enzymen ist auch hier eine vollständige.

Obige Erwägungen behalten ihre Gültigkeit ganz unabhängig davon, ob man der enzymatischen Wasserstoff-Übertragung die primäre Wasser-Spaltung nach der von uns vertretenen Traubeschen Theorie oder die Wasser-Anlagerung und nachträgliche Dehydrierung der Substrat-Hydrate nach Wieland zugrunde legt. Eigentlich ist schon jede Wasser-An-

¹³⁾ Die Fermente und ihre Wirkungen, Leipzig 1926. ¹⁴⁾ l. c., S. 1305.

lagerung eo ipso eine Wasser-Spaltung. Denn das Wasser-Molekül wird nicht als solches, sondern — entsprechend den entgegengesetzten Affinitäten der Elemente eines Körpers oder eines Systems von Körpern — als H-Atom und OH-Gruppe addiert. Die primäre Wasser-Spaltung ist daher in allen Fällen die erste Phase der Oxydo-Reduktion. Was die weiteren Phasen anbelangt, so ist bei dem gegenwärtigen Stand unserer Kenntnisse eine endgültige Entscheidung noch nicht möglich. Für die sauerstoff-lose Oxydation des Kohlenmonoxyds zu Kohlendioxyd in Gegenwart von Palladium z. B. postuliert Wieland zunächst Wasser-Anlagerung (also primäre Wasser-Spaltung am Kohlenstoff-Atom) unter Bildung von Ameisensäure und dann Entziehen beider angelagerten Wasserstoff-Atome durch das Palladium. Wir halten es für wahrscheinlicher, daß aus aktiven Wasser-Molekülen die Wasserstoff-Atome vom Palladium, die Hydroxyle vom Kohlenmonoxyd direkt aufgenommen werden. In erster Annäherung erscheint stets der kürzere und einfachere Weg als der richtige.

11. H. Gall und H. Mengdehl: Über die Anlagerung von Nitrosylchlorid an Metallsalze.

[Aus d. Anorgan. Laborat. d. Techn. Hochschule München.]

(Eingegangen am 19. November 1926.)

Schon seit längerer Zeit ist die Reaktion von Stickoxyd mit Eisen- und Kupfersalzen bekannt. W. Manchot¹⁾ verdanken wir ausführliche Studien über Darstellung und Eigenschaften der hierbei auftretenden Verbindungen. Im Verlauf einer Arbeit über das Verhalten des Nitrosylchlorids gegenüber Metallsalzen haben wir eine neue Bildungsweise derartiger NO-Verbindungen aufgefunden.

Darstellung von $MnCl_3, NO$.

Die erste Stickoxyd-Verbindung des Mangans wurde vor kurzem von W. Manchot und H. Schmid²⁾ in Form des K_3MnCy_5, NO beschrieben. Eine den Verbindungen $FeSO_4, NO$ und $CuCl_2, NO$ analoge Mangan-Stickoxyd-Verbindung war bis jetzt nicht bekannt. Ließen wir sorgfältig bei 260° entwässertes $MnCl_2$ mit $NOCl$, das nach Rüst³⁾ dargestellt und durch Fraktionieren gereinigt war, bei -10^0 reagieren, so war zunächst keinerlei Einwirkung zu erkennen. Überließen wir aber das System im zugeschmolzenen Rohr einige Zeit sich selbst und dunsteten bei -10^0 das überschüssige $NOCl$ durch sehr vorsichtiges Evakuieren ab, so erhielten wir einen ockerfarbenen Rückstand. Die Substanz reagiert heftig mit Wasser oder verdünnten Säuren unter Entwicklung von Stickoxyden, wobei die Lösung die Farbe des $MnCl_2$ annimmt.

Zur Ausführung der Analyse wurde in einem Rundkolben nach Durchleiten von scharf getrocknetem CO_2 eine beliebige Menge der Substanz eingeworfen und durch einen Tropftrichter ausgekochtes Wasser zugegeben. Das entwickelte Gas wurde schließlich

1) W. Manchot, A. **350**, 368 [1906], **372**, 153 [1910]; B. **47**, 1601, 1614 [1914]; Ztschr. angew. Chem. **23**, 2113 [1910], **24**, 13 [1911], **25**, 1655 [1912]; Ztschr. anorgan. Chem. **140**, 22, 37 [1924].

2) W. Manchot und H. Schmid, B. **59**, 2360 [1926].

3) Rüst, Anleitung zur Darst. anorgan. Präpp. [1903].