

Die alkoholische Mutterlauge lieferte beim Einengen etwas Pyron und weiterhin ein zähes, gelbes Öl, das vielleicht ein Umsetzungsprodukt der Mono-oxymethylen-Verbindung enthielt. Daß das rohe Natriumsalz ein Gemisch von Bis- und Mono-oxymethylen-Verbindung war, ergab eine Analyse des daraus hergestellten Kupfersalzes. Sie ließ darauf schließen, daß beide etwa zu gleichen Teilen darin vorhanden waren.

Mono-oxymethylen-dibenzylketon

entsteht dagegen vorwiegend, wenn man wie bei der Herstellung des Pyrons verfährt, jedoch bei der Kondensation je 1 Mol. der Komponenten verwendet. Das Natriumsalz liefert dann beim Fällen mit Säure eine gelbliche, zähe Masse, aus der sich beim Anreiben mit Alkohol etwas Pyron abscheidet. Die Mutterlauge gab eine starke Rotfärbung mit Eisenchlorid und hinterließ beim Verdunsten ein zähes, gelbes Öl, das der Hauptsache nach aus Mono-oxymethylen-Verbindung bestand.

1.4-Diphenyl-5(3)-benzyl-pyrazol (III oder IV).

Erwärmt man dieses Öl mit der gleichen Menge Phenyl-hydrazin in 50-proz. Essigsäure etwa 1 Stde. auf dem Wasserbade, so fällt das Pyrazol aus. Es bildet aus Alkohol weiche, zu Büscheln vereinigte Nadeln vom Schmp. 128⁰.

0.0560 g Subst.: 0.1745 g CO₂, 0.0293 g H₂O. — 0.1183 g Subst.: 9.3 ccm N (19⁰, 742 mm).

C₂₂H₁₈N₂. Ber. C 85.15, H 5.81, N 9.03. Gef. C 84.99, H 5.86, N 8.97.

Diäthylketon und Ameisensäure-äthylester

wurden im Verhältnis 1 : 2 gemischt unter Eiskühlung zu einer Suspension von 2 Mol. Natriumäthylat in der 10-fachen Menge absol. Äther zugetropft und dann bei Zimmer-Temperatur stehen gelassen. Es entstand vorübergehend eine dicke, klebrige Masse, die bald feste, bröcklige Form annahm. Das Salz wurde rasch abgesaugt, da es hygroskopisch war, und sofort mit Äther gewaschen. Beim Lösen in wenig Wasser und Zusetzen von verd. Salzsäure unter Eiskühlung fiel zunächst ein Öl aus, das aber bald zu einer Krystallmasse erstarrte. Diese erwies sich als identisch mit der bekannten Mono-oxymethylen-Verbindung des Diäthylketons⁷⁾.

162. Heinrich Wieland und Hermann Sutter: Einiges über Oxydasen und Peroxydasen. (Über den Mechanismus der Oxydationsvorgänge, XIII.)

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

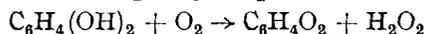
(Eingegangen am 4. April 1928.)

I.

In der XI. Abhandlung auf dem oben gekennzeichneten Gebiet hat der eine von uns gemeinsam mit F. G. Fischer¹⁾ über ein aus Pilzen iso-

¹⁾ B. 59, 1181 [1926].

liertes Präparat berichtet, das die Autoxydation von Hydrochinon unter Bildung der äquivalenten Menge Hydroperoxyd:



beschleunigte, das thermostabil und gegen Blausäure wenig empfindlich war. Das Stoffgemenge, dem somit der Charakter eines Enzyms fehlte, erinnerte an Gemische von Salzen organischer Säuren, wie sie Euler und Bolin aus höheren Pflanzen abgetrennt haben.

Wir wollten dieses, durch mehrfache Umfällungen aus dem Saft von *Lactarius vellereus* gewonnene Salzgemenge an einem neuen Material von der Ernte des vorigen Jahres etwas näher analytisch untersuchen, hatten aber bei den vorgenommenen Fällungsversuchen nicht den gewollten Erfolg, sei es, daß die Bedingungen nicht mehr richtig getroffen wurden, sei es, daß das neue, in Oberbayern gewachsene Pilz-Material von anderer Zusammensetzung war als das frühere, im Schwarzwald geerntete. An Stelle des autoxydatisch wirksamen Salzgemisches haben wir diesmal das Oxydase-Enzym, das zuerst A. Bach und B. Sbarsky²⁾ gefunden haben, isoliert und nach weiterer Reinigung, die es von Katalase und Peroxydase völlig befreite, genauer geprüft.

Wir geben zuerst unsere Darstellungsmethode: 10 kg frisch gesammelter Pilze der Art *Lactarius vellereus*, die im September 1927 in der Nähe von München (bei Kirchseon) geerntet waren, wurden nach oberflächlicher Reinigung durch eine Fleisch-Hackmaschine getrieben, der Pilzbrei wurde sofort in der Buchner-Presse bei 200 Atm. durch Trikotstoff gepreßt, zu dem trüben Saft (6 l) fügte man 1800 ccm Weingeist und zentrifugierte nach 1-stdg. Stehen von dem entstandenen Niederschlag ab. Diese erste Fällung erwies sich für die Autoxydation von Hydrochinon, das wir für unsere Messungen als Substrat benutzt haben, als so gut wie unwirksam. Es waren in mehreren Arbeitsgängen mit verschiedenem Material trocken 20—30 g. Zur klaren Lösung werden nun weitere 13.2 l 96-proz. Alkohols hinzugegeben, das bedeutet die Herstellung einer Alkohol-Konzentration von 68 %. Nach 1-stdg. Stehen wird abermals zentrifugiert, den Niederschlag wäscht man mit Alkohol und Äther und trocknet ihn dann sofort im Vakuum-Exsiccator. Von diesem sehr wirksamen Präparat erhält man etwa die gleiche Menge wie die Vorfällung. Eine weitere Steigerung der Alkohol-Konzentration bringt keine lohnende Steigerung der Ausbeute. Von der Fällung mit Magnesiumsulfat, die Bach anwendet und deren sich auch Lövenskiöld (a. a. O.) bei der ersten Material-Beschaffung bedient hatte, haben wir Abstand genommen. Das Präparat, das man so erhält, stellt ein braunes Pulver dar, das in Wasser nicht vollständig löslich ist. Sein Aschengehalt beträgt nur 7 % gegenüber 23 % bei Bach. An Eisen enthält das rohe Enzym-Präparat 0.1—0.2 % (in der Asche aus 0.3 g Substanz colorimetrisch mit Ammonium-rhodanid bestimmt).

Eine weitere Reinigung geschah durch Dialyse: 0.75 g Roh-Enzym werden, in einer Fischblase in 150 ccm Wasser gelöst bzw. suspendiert, unter Toluol-Zusatz 2 Tage lang gegen destilliertes Wasser, das häufig erneuert wird, dialysiert. Etwa 0.4 g inaktiver Stoffe geht durch die Membran. In einem besonderen Versuch wurde die Außenflüssigkeit im Vakuum bei 25° eingedampft und die Unwirksamkeit des Rückstandes festgestellt. In der Lösung innen bleiben 0.12 g, der ungelöste Rest ist ohne Wirkung. Die klare Lösung wird bei 25° im Vakuum auf ungefähr 10 ccm eingengt, dann fällt man mit dem 4-fachen Volumen Alkohol das Enzym aus, das abzentrifugiert und wie oben getrocknet wird. Diese Reinigung bringt keinen Verlust an aktivem Stoff. Das so gewonnene Präparat, ein hellbraunes Pulver, ist in Wasser klar löslich.

Die Bestimmung der Wirksamkeit wurde in der gleichen Apparatur vorgenommen, wie sie von Wieland und Fischer (a. a. O.) beschrieben ist.

²⁾ Biochem. Ztschr. **34**, 474 [1911].

5 ccm $m/4$ -Hydrochinon-Lösung + 5 ccm Wasser + 5 ccm $m/6$ -Phosphat-Puffer ($p_H = 7$) wurden mit abgewogenen Mengen Enzym unter Beachtung gleicher Schüttelgeschwindigkeit und konstanter Temperatur — gewöhnlich bei 20^0 — jeweils 10 Min. unter Sauerstoff geschüttelt. Die Menge des aufgenommenen Sauerstoffs diene als Maß der Wirksamkeit. Bei genügender Sauerstoff-Aufnahme kam Chinhydron schön krystallisiert zur Abscheidung.

Die nachstehende Tabelle belehrt über die mit der Reinigung zunehmende Wirksamkeit.

Präparat	1. Pilzbrei 1 g	2. Preßsaft 1 ccm	3. Roh- Enzym 0.05 g	4. durch Dia- lyse gereinigt 0.003 g
O ₂ -Aufnahme in ccm nach 10 Min. .	0.64	0.77	4.9	1.1

Von 2 zu 3 ist eine Verstärkung der Enzymwirkung um das 130-fache, von 3 zu 4 eine weitere um rund das 4-fache erreicht. 1 g des dialysierten Präparates ist rund 630-mal wirksamer als 1 g Pilzbrei. Dabei wird im Durchschnitt nicht viel mehr als $\frac{1}{3}$ von der gesamten Fermentsubstanz, die im Preßsaft enthalten ist, isoliert. Der hauptsächlichste Verlust trifft schon die vorhergehende Operation und wird bedingt durch das im Preßrückstand festgehaltene Material.

1 g davon enthielt (Mittel von 2 Versuchen) eine Enzymmenge, die in 10 Min. 0.84 ccm O₂ auf unsere Hydrochinon-Lösung übertrug. Da der Rückstand 40% des Pilzbreis ausmacht, bleiben rund 44% des Gesamt-Enzyms in den ausgepreßten Rückständen.

Als man 1 kg Preßrückstand mit 1 l Wasser 6 Stdn. unter Zusatz von Toluol schüttelte und erneut abpreßte, ging ungefähr die Hälfte des vorher zurückgehaltenen Ferments in Lösung.

1 ccm der Lösung übertrug in 10 Min	0.42 ccm O ₂
1 g des 2. Rückstandes übertrag in 10 Min.	0.46 „ O ₂ .

Der große Alkohol-Bedarf, der zur Fällung der wirksamen Substanz erforderlich wäre, lohnt die präparative Aufarbeitung der Preßrückstände nicht. Der übrige Verlust bei der Gewinnung unserer Präparate wird durch die Unvollständigkeit der alkoholischen Fällung bedingt.

Das verarbeitete Material war sehr verschieden in seiner Wirksamkeit. Aus den 181 Preßsaft, die auf Grund unseres Meßverfahrens zu einer O₂-Übertragung von 13900 ccm fähig waren, wurden 70 g Roh-Enzym mit einer O₂-Leistung von 4880 ccm isoliert. Versuche der weiteren Reinigung durch Adsorption haben vorerst kein Ergebnis gehabt. Wir haben uns daher mit dem Präparat begnügt, in dem die Wirksamkeit gegenüber dem Pflanzenmaterial auf das 600-fache gesteigert war. Mit 1 mg dieses Präparates kann man in 10 Min. 4 mg Hydrochinon zu Chinon oxydieren. Erhitzt man die wäßrige Lösung des Stoffes auf 100^0 , so ist schon nach 3 Min. seine Wirksamkeit vollkommen zerstört. Dies steht im Einklang mit den Angaben von Bach und Sbarsky; dagegen ist von einer Wiederkehr der Aktivität nach längerem Stehen in unserem Fall nicht die Rede.

Eine Lösung, die in dem üblichen Ansatz 0.003 g Enzym-Präparat enthielt, nahm zuerst in 10 Min. 1.1 ccm O₂ auf, nach 3 Min. bei 100^0 0, nach 24-stdg. Stehen in der Kälte ebenfalls 0 ccm.

Hemmung durch Blausäure: Das thermostabile Präparat von Wieland und Fischer war gegen Blausäure auffallend wenig empfindlich. Die Phenol-Oxydase, von der wir hier berichten, wird in ihrer Wirkung

durch Blausäure gehemmt, und zwar durch verhältnismäßig geringe Dosen. In einer für Blausäure $n/500$ -Lösung geht die Geschwindigkeit, mit der Hydrochinon in Gegenwart des Fermentes autoxydiert wird, auf $1/3$ zurück. Immerhin ist der Einfluß der Blausäure hier viel geringer als gegenüber der Katalase oder der Peroxydase, von der im nächsten Kapitel die Rede ist.

HCN	—	$m/1000$	$m/500$	$m/100$
ccm O_2 -Verbrauch in 10 Min.	0.98	0.65	0.32	0

Ansatz wie beschrieben, mit 0.003 g Enzym.

Ein Präparat von Oxydase, das aus dem Preßsaft von Kartoffelschalen durch Fällung mit Alkohol isoliert war, zeigte eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Blausäure.

0.1 g dieses Präparates wurden unter denselben Bedingungen wie oben zur Autoxydation von Brenzcatechin verwendet. Die Werte sind Mittelwerte aus je 3 bis 5 Versuchen.

HCN	—	$m/10000$	$m/5000$	$m/2000$	$m/1000$	$m/500$
O_2 in 10 Min. .	3.0	2.06	2.26	1.27	0.65	0.26

Hemmung der Pilz-Oxydase durch HCN: $m/1000$: 33 %, $m/500$: 67 %.
 „ „ Kartoffel-Oxydase „ : „ : 78 %, „ : 93 %.

Wir halten es für möglich, daß ein Teil der katalytischen Wirkung der Kartoffel-Oxydase auf Eisensalze zurückzuführen ist, und daß die größere Empfindlichkeit gegen Blausäure damit zusammenhängt. Diesen Versuchen legen wir übrigens nicht den gleichen Wert bei wie denen mit dem Pilz-Enzym, da das aus der Kartoffel nur z. T. in Wasser löslich und nicht weiter gereinigt war.

Was uns an dem Pilz-Präparat besonders interessierte, das war die Frage, ob bei der durch seine Gegenwart katalytisch beschleunigten Autoxydation des Hydrochinons Hydroperoxyd nachweisbar sein werde. Die Voraussetzungen, sein Auftreten festzustellen, waren gegeben. Durch die Dialyse war das Enzym-Präparat so gut wie vollkommen katalase-frei geworden. Die Katalase war teils von der Membran adsorbiert, teils war sie im unlöslichen Rückstand geblieben.

Nachweis des Fehlens der Katalase: 5 mg des Enzym-Präparats wurden in 5 ccm H_2O mit 0.7 mg H_2O_2 30 Min. unter Stickstoff geschüttelt. Nach dieser Zeit war das Hydroperoxyd colorimetrisch mit Titan(IV)-sulfat in der eingesetzten Menge nachzuweisen.

Es gelang nicht, Hydroperoxyd im Gang der Autoxydation anzutreffen, und wir müssen aus unseren Beobachtungen den Schluß ziehen, daß es bei der durch das thermostabile Enzym-Präparat beschleunigten Autoxydation — im Gegensatz zu den durch das frühere thermostabile Präparat geschaffenen Verhältnissen — auch nicht intermediär entsteht. Die Menge Hydroperoxyd, die auf Grund der O_2 -Aufnahme sich ergeben würde, bleibt nämlich unverändert in der Lösung, der man sie vor Beginn des Versuches — Enzym, Hydrochinon + O_2 — zugesetzt hat. Ja, der zehnte Teil dieser Menge war am Ende eines vergleichenden Ansatzes noch in voller Deutlichkeit mit Titanschwefelsäure nachzuweisen.

Auch fand sich, als wir eine kleine Menge des Präparates von Wieland und Fischer dem Enzym-Ansatz zufügten, also den ganzen Ansatz unter

Sauerstoff schüttelten, am Ende des Versuches Hydroperoxyd, mit aller Deutlichkeit erkennbar, in der Lösung. Es ist also ausgeschlossen, daß Katalase oder Peroxydase, oder auch Eisen, Beimengungen, die man in dem Enzym-Präparat annehmen könnte, den Nachweis des Hydroperoxyds verhindert haben.

Eine ganz geringe peroxydatische Leistung schien allerdings in dem Präparat feststellbar.

10 mg des durch Dialyse gereinigten Enzyms ließ man auf die Lösung von 50 mg H_2O_2 und 5 g Pyrogallol in 2 l Wasser 5 Min. lang bei O_2 -Ausschluß einwirken. Das Wasser war durch 1-stdg. Einleiten von Wasserstoff von gelöstem Sauerstoff befreit, auch während des Versuches wurde Wasserstoff eingeleitet.

Die Peroxydase-Wirkung entspricht einer Purpurogallin-Zahl von 1, ist also sehr gering. Es ist nicht ausgeschlossen, daß Spuren von Sauerstoff die Oxydation verursacht haben. Eine später ausgeführte Kontrolle erwies das völlige Fehlen von Peroxydasen in unserem gereinigten Oxydase-Präparat, indem nämlich der oben beschriebene Versuch, ohne Hydroperoxyd durchgeführt, die gleiche Purpurogallin-Zahl ergab: In 2 Versuchen 1.26 und 1.27. Zweifellos waren Spuren von O_2 im Wasserstoff enthalten.

Von dem alten, thermostabilen Pilz-Präparat von Wieland und Fischer ist noch zu erwähnen, daß sein wirksamer Bestandteil durch Fischblase dialysiert werden kann. Die eingeengte Außenflüssigkeit war noch imstande, bei der Autoxydation von Hydrochinon Hydroperoxyd zu bilden, das mit aller Schärfe nachgewiesen werden konnte.

Abhängigkeit der Autoxydationsgeschwindigkeit vom p_H der Lösungen (s. Fig. 1).

Die H-Konzentration wurde mit $m/5$ -Phosphat-Phosphorsäure jeweils eingestellt unter ausreichender Pufferung. In allen Ansätzen 5 mg Roh-Enzym mit 5 ccm $m/4$ -Hydrochinon und 5 ccm Pufferlösung. Dauer 60 Min. $T = 17^0$.

p_H	2.6	3.6	4.0	4.6	5.6	6.6	6.6
O_2 ccm . .	1.11	2.61	3.20	3.32	2.54	1.24	1.24

Das Optimum liegt im schwach sauren Gebiet, bei p_H 4.6. Alle Reaktionslösungen wurden am Ende des Versuches auf Hydroperoxyd geprüft, überall mit negativem Befund.

Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Hydrochinon-Konzentration.

Die Lösung von 3 mg gereinigtem Enzym-Präparat wurde mit verschiedenen Mengen $m/4$ -Hydrochinon-Lösung, nämlich 5, 2.5, 1.25, 0.62 ccm, mit jeweils 5 ccm $m/5$ -Phosphat-Puffer $p_H = 4.6$ unter O_2 geschüttelt. Das Volumen jeder Lösung betrug 12 ccm. Nach je 10 Min. wurde die O_2 -Aufnahme abgelesen.

Es ergab sich, daß, in hohem Maße unabhängig von der Substrat-Konzentration, in gleichen Zeiten gleiche Mengen umgesetzt werden.

Es liegt eine Reaktion nullter Ordnung vor, wohl dadurch bedingt, daß die Enzym-Teilchen sich aus Substrat-Lösungen von größeren oder

kleineren Konzentrationen mit genügend großer Geschwindigkeit adsorptiv sättigen, so daß in jedem Fall die der Messung unterliegende Reaktion unter den gleichen Verhältnissen abläuft.

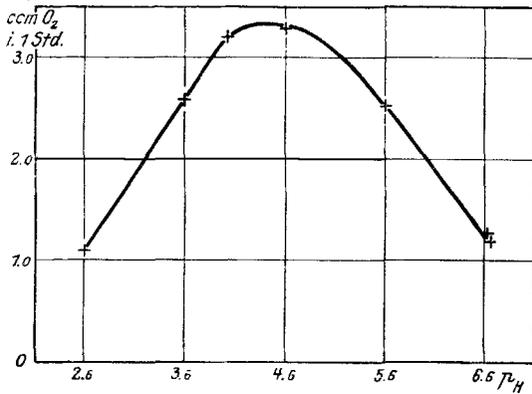


Fig. 1. pH-Abhängigkeit.

Man sieht aus Fig. 2, daß in I und II, aber auch in den Versuchen mit geringer Hydrochinon-Konzentration (III und IV) die O₂-Werte sich in der Nähe der Geraden halten, die jene Reaktionsordnung zur Darstellung bringt. Dies gilt fast bis zu der Grenze, wo alles Hydrochinon verbraucht ist (a und b auf der rechten Seite der Figur). Die O₂-Aufnahme über a und b

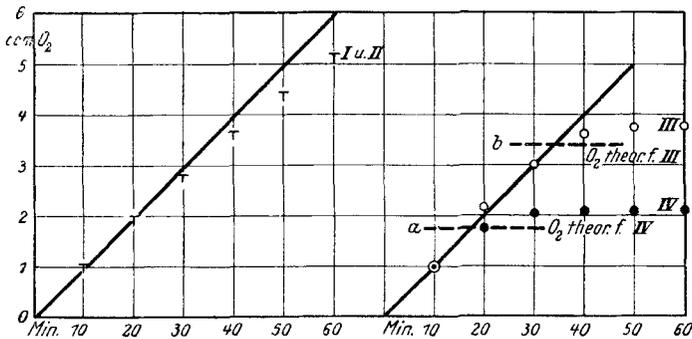


Fig. 2.

I. 5 ccm m/4-Hydrochinon : — III. 1.25 m/4-Hydrochinon : ○
 II. 2.5 „ „ „ : | IV. 0.62 „ „ „ : ●

hinaus erklärt sich vielleicht daraus, daß die Lösungen zu Anfang nicht mit Sauerstoff gesättigt sind, vielleicht aber auch aus einer nebenhergehenden Reaktion, bei der für 1 Mol. Hydrochinon 1 Mol. O₂ umgesetzt wird. Die durch a und b gekennzeichneten Werte beziehen sich natürlich auf das Verhältnis Hydrochinon : O₂/2.

Für die Autoxydation von J' finden wir unser Oxydase-Präparat nicht oder so gut wie nicht wirksam. Dies ist von Bedeutung, weil die Jod-Stärke-Reaktion sehr häufig zum Nachweis von pflanzlichen Oxydasen benutzt wird.

Es wurden jeweils 6 mg Enzym-Präparat mit 5 ccm $m/5$ -Phosphat-Puffer von verschiedenem p_H und mit jeweils 5 ccm 5-proz. KJ-Lösung vermischt, unter O_2 60 Min. in der üblichen Weise geschüttelt.

Lösung von p_H	2.6	3.6	4.6	5.6
ccm $n/100$ -Thio-sulfat . . .	0.21	0.68	0.61	0.1

Das sind so geringe Umsätze, daß sie auf Spuren von Eisen zurückgeführt werden können.

II.

Mit dem Enzym Peroxydase haben wir uns beschäftigt, um es hinsichtlich seiner Hemmbarkeit mit der von uns in ziemlich reiner Form dargestellten Pilz-Oxydase vergleichen zu können, und um zu sehen, ob irgendwelche Beziehungen diese beiden Arten oxydations-beschleunigender Stoffe miteinander verbinden. Denn die alte Anschauung von Bach, nach der das Oxydase-System einen Peroxydase-Bestandteil enthalten soll, ist, soweit wir sehen, noch nicht experimentell widerlegt.

Wir haben unser Präparat nach dem von Willstätter vervollkommeneten Bachschen Verfahren aus Meerrettich dargestellt³⁾. Durch einmalige Anwendung des Aluminiumhydroxyd-Adsorptionsverfahrens gelangten wir zu einem schon recht guten Produkt von der Purpurogallin-Zahl 280⁴⁾. Es war ein braunes, klar in Wasser lösliches Pulver.

Die Oxydation von Hydrochinon durch molekularen Sauerstoff wird durch das Enzym in keiner Weise beschleunigt.

5 mg Enzym-Präparat wurden zu einer Lösung von 5 ccm $m/4$ -Hydrochinon, 5 ccm Wasser und 5 ccm $m/5$ Phosphat $p_H = 6.4$ gebracht. Nach 1-stdg. Schütteln bei 18° unter Sauerstoff war keine meßbare Menge des Gases aufgenommen.

Wir erinnern daran, daß umgekehrt die von uns dargestellte Oxydase auch keine H_2O_2 -aktivierende Wirkung zeigte.

Ebensowenig war eine kombinierte Wirkung der beiden Enzym-Präparate zu beobachten:

Eine Oxydase-Lösung mit 6 mg Enzym-Präparat übertrug auf 5 ccm $m/4$ -Hydrochinon in dem üblichen Ansatz in 30 Min. 4.96 ccm O_2 , dieselbe Lösung nach Zugabe von 5 mg unseres Peroxydase-Präparates (P.-Z. 280) in der gleichen Zeit 5.60 ccm. Die Differenz überschreitet kaum die Grenze der Versuchsfehler.

Hemmungsversuche⁵⁾.

Blausäure: Die Empfindlichkeit der Peroxydase gegenüber der Blausäure ist ungemein groß. Schon in $m/200000$ -Lösung setzt diese die katalytische Wirkung auf die Hälfte herab.

HCl	—	$m/400000$	$m/200000$	$m/100000$	$m/50000$
Purpurogallin-Zahl . . .	280	185	130	66	37

Die Anordnung der Versuche geschah nach der Angabe von Willstätter und Stoll. Angewandt jeweils 1 mg Enzym-Präparat in 2 l $m/100$ -Phosphat-Lösung von $p_H = 6.4$. Der Versuch wurde mit dem gleichen Ergebnis bei $p_H = 5.6$ wiederholt.

³⁾ A. 422. 71 [1921].

⁴⁾ Willstätter u. Stoll, A. 416, 43 [1918].

⁵⁾ Ältere Angaben von A. Bach (B. 40, 230, 3185 [1907]) über die Hemmung der Peroxydase durch Blausäure, Hydrazin und Hydroxylamin, allerdings an ganz rohen Präparaten angestellt, finden in unseren Versuchen, wenigstens in quantitativer Hinsicht, keine Bestätigung.

Die antikatalytische Wirkung der Blausäure ließ sich nicht, wie in manchen anderen Fällen, rückgängig machen. Auch nach 1-stdg. Evakuieren der HCN-haltigen Lösungen unter Einleiten von Luft in die Capillare blieb die Hemmung unverändert bestehen.

Schwefelwasserstoff schwächt die Wirkung des Peroxydase-Ferments noch deutlich stärker als Blausäure. Seine Dosierung erfolgte mit Hilfe verdünnter Na₂S-Lösung, die in den jeweils angegebenen Mengen zu der gepufferten (p_H = 6.4) Versuchslösung gefügt wurde.

H ₂ S	—	m/800000	m/400000	m/200000	m/100000
Purpurogallin-Zahl ...	280	160	85	45	20

In m/200000-Konzentration bewirkt H₂S bereits eine Hemmung auf 1/6. Aufhebung der Schädigung ist auch hier nicht möglich.

Maß der Hemmung in %.

m-Konz.	8.10 ⁻⁵	4.10 ⁻⁵	2.10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	5.10 ⁻⁴
HCN	—	33	54	76	87
H ₂ S	43	70	84	93	—

Hydrazin und Hydroxylamin: Auch diese beiden Stoffe üben eine bedeutende hemmende Wirkung aus, die zwar von der des Schwefelwasserstoffs und der Blausäure der Größenordnung nach abweicht, immerhin aber den Grad erreicht, wie er der Blausäure-Schädigung in anderen Fällen zukommt.

a) NH ₂ .NH ₂	—	m/2000	m/1000
b) NH ₂ .OH	—	—	—
Purpurogallin-Zahl	280	a 150 b 190	a 120 b 120

Ammoniumsulfat in m/500-Konzentration und Anilin-Chlorhydrat (m/1000) hemmten die Oxydation von Pyrogallol nicht. Kohlenoxyd ist ohne jegliche Wirkung. Es wurde die das Enzym enthaltende Versuchslösung vor Zugabe des Hydroperoxyds durch 1-stdg. Einleiten mit Kohlenoxyd gesättigt. Die Konzentration entsprach gemäß der Löslichkeit des Gases (0.023 bei 20°) der einer m/1000-Lösung. Purpurogallin-Zahl 270 statt 280.

Auch von arseniger Säure wird keine nennenswerte Hemmwirkung ausgeübt.

Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff sind ohne jeglichen Einfluß auf die Wirksamkeit des Ferments; einer mechanischen Schädigung, wie sie von Wieland und Haussmann⁶⁾ an Katalase-Präparaten durch Einwirkung neutraler Gase festgestellt worden ist, ist die Peroxydase aus Meerrettich nicht zugänglich. Mit fuchsin-schweflicher Säure wird keine Färbung beobachtet. Diäthylperoxyd vermag nach vorläufigen Versuchen das Hydroperoxyd nicht zu ersetzen.

Da die hemmenden Reagenzien im wesentlichen solche sind, die chemisch mit Aldehyden reagieren, könnte man die Anschauung von Gertrud Woker, der wirksame Bestandteil des Peroxydase-Ferments sei eine Aldehydgruppe, durch die H₂O₂ aktiviert werde, in unseren Beobachtungen angedeutet finden.

⁶⁾ A. 445, 189 [1925].

Diese Hypothese hat sich neuerdings Gallagher⁷⁾ zu eigen gemacht, ohne eigentlich sie stützendes Material beizubringen. Wir halten derartige Spekulationen für verfrüht. Was wir festgestellt haben, scheint uns aber mehr gegen als für die Auffassung der Peroxydase-Wirkung als Schwermetall-Katalyse zu sprechen.

163. H. Fischer und Bruno Pützer: Einige Beobachtungen über Pyrrole und Komplexsalze.

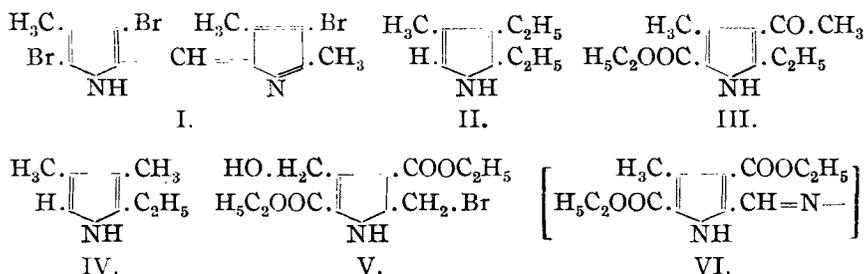
[Aus d. Organ.-chem. Institut d. Techn. Hochschule München.]

(Eingegangen am 2. April 1928.)

Bei der Oxydation des Brom-porphyrins I¹⁾ war Brom-citraconimid erhalten worden, und es war deshalb von Interesse, diese für die Konstitutions-Ermittlung des genannten Porphyrins wichtige Reaktion auch an synthetischem Material eindeutigen Ursprungs zu prüfen. Wir oxydierten deshalb das schon mit Scheyer²⁾ früher erhaltene, gebromte Methen aus 2,4-Dimethyl-pyrrol (I), dessen Darstellung verbessert wurde, mit Chromsäure-Schwefelsäure; in guter Ausbeute entstand in der Tat Brom-citraconimid.

Weiter berichten wir über eine Reihe von Pyrrolen mit Äthylgruppen in α -Stellung, die synthetisiert wurden zu einer Zeit, als die indigoide Formulierung bei Porphyrinen noch möglich und deshalb als reduktive Spaltprodukte in α -Stellung äthylierte Pyrrole bei der Reduktion des Hämins erwartet werden konnten. Bei Kenntnis ihrer Eigenschaften wäre die Aufindung natürlich beträchtlich vereinfacht gewesen.

Es handelt sich zunächst um die Synthese von 2,3-Diäthyl-4-methylpyrrol (II). Zu diesem Zwecke wurde in 2-Äthyl-4-methyl-5-carbäthoxy-pyrrol³⁾ nach Friedel-Crafts der Acetylrest eingeführt und so



III erhalten. Der Ester wurde in die Carbonsäure und in das freie 4-Methyl-2-äthyl-3-acetyl-pyrrol übergeführt, die gut krystallisieren. Um Körper II zu erhalten, kann man dann entweder das zuletzt genannte Pyrrol, zweckmäßiger aber III, nach Wolff-Kishner reduzieren. Die Ausbeute an II ist gut; es ist charakterisiert durch ein gut krystallisierendes Pikrat,

⁷⁾ Biochem. Journ. **17**, 515 [1923], **18**, 2929 [1924].

¹⁾ B. **60**, 1862 [1927].

²⁾ A. **434**, 242 [1923].

³⁾ A. **442**, 1 [1925].