

**233. Richard Kuhn und Albert Wassermann:
Über die Abhängigkeit der katalatischen und oxydatischen Wirkungen
des Eisens von seinem Adsorptionszustand.**

Aus d. Laborat. für allgem. analyt. Chemie d. Eidgen. Techn. Hochschule Zürich.

(Eingegangen am 2. Juni 1928.

I. Im adsorbierten Zustand ist die Wirksamkeit von Enzymen vielfach gleich groß wie in wäßriger Lösung (Beispiel: Hefe-Saccharase-Tonerde¹⁾), in anderen Fällen (Beispiel: Pankreas-Lipase-Tristearin²⁾) geht die Adsorption mit dem Verlust der Aktivität Hand in Hand. Da aus inaktiven Adsorbaten unter geeigneten Bedingungen das Enzym in wirksamem Zustande zurückgewonnen werden kann (Beispiel: Zerlegung von Saccharase-Blei-Adsorbaten bzw. -Fällungen mit Dinatriumphosphat³⁾) folgt, daß die Inaktivierung durch Adsorption nicht auf Zerstörung des Enzyms beruhen kann, sondern durch eine besondere Bindungsweise bedingt sein muß. Es wurde die Ansicht vertreten⁴⁾, daß neben anderen Umständen die räumliche Ausrichtung der Enzym-Teilchen in den Adsorptions-Schichten die angeführten Erscheinungen bedinge.

Auch für die Aktivierung von Enzymen durch Adsorption liegen Anhaltspunkte vor. R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz und F. Memmen⁵⁾ führen die Lipase-Aktivierung durch Calcium-Oleat oder durch Calcium-Oleat-Albumin zurück auf die Erzeugung von Kolloidteilchen, die zugleich auf Enzym und Substrat adsorbierend wirken: Komplexe und gekoppelte Adsorbate.

In dieser Abhandlung wird gezeigt, daß die Wasserstoffperoxyd-Zersetzung durch Hämin in ganz ähnlicher Weise vom Adsorptionszustande des Hämins abhängt. Man hat es in der Hand, je nach der Wahl des Adsorptionsmittels die Wirksamkeit zu steigern, sie unverändert zu lassen oder zu vernichten. Ferner wird gezeigt, daß die Fähigkeit des Hämins, molekularen Sauerstoff zu übertragen, ebenfalls von seinem Adsorptionszustande abhängt.

Bemerkenswert dabei ist, daß im allgemeinen Oxydase- und Katalase-Wirkung durch Überführung des Hämins in ein bestimmtes Adsorbat keineswegs gleichsinnige Änderungen erfahren. Es kommt vor, daß durch dasselbe Adsorbens die Wasserstoffperoxyd-Zersetzung stark aktiviert, die Sauerstoff-Übertragung aber gehemmt wird.

Endlich werden die katalatischen Wirkungen des Eisens im adsorbierten und „eingebetteten“ Zustande mit denjenigen von Ferrichlorid in Lösung verglichen.

II. Wird Hämin an Tierkohle adsorbiert, so findet eine starke Aktivierung der Katalase-Wirkung statt. Sie erreicht, unter den im Versuchsteil beschriebenen Bedingungen, über 200%. An Faser-Tonerde

¹⁾ R. Willstätter und R. Kuhn, *Ztschr. physiol. Chem.* **116**, 53 [1921].

²⁾ R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz und F. Memmen, *Ztschr. physiol. Chem.* **125**, 93 [1922/23].

³⁾ R. Willstätter J. Graser und R. Kuhn, *Ztschr. physiol. Chem.* **123**, 1 [1922].

⁴⁾ H. R. Kruyt und C. F. van Duyn, *Rec. Trav. chim. Pays-Bas* **40**, 249 [1921]; R. Kuhn, *Naturwiss.* **11**, 732 [1923].

⁵⁾ *Ztschr. physiol. Chem.* **125**, 93 [1922/23].

ist unter denselben Bedingungen das Hämin, wenn man von den ersten Reaktionsstadien absieht, sehr stark gehemmt. Adsorbiert man an Metazinnsäure, so verläuft die H_2O_2 -Katalyse genau so wie im Kontrollversuch ohne Adsorbens. Damit sind alle drei Möglichkeiten verwirklicht.

III. Leinöl kann nach M. E. Robinson⁶⁾ in Gegenwart von Hämoglobin und von Hämin Sauerstoff aufnehmen. Wiederholt man die Versuche mit einem Hämin-Kohle-Adsorbat, so findet man die Wirkung des Hämins bedeutend geschwächt. Das Tonerde-Adsorbat ist oxydatisch ebenfalls weniger wirksam als gelöstes Hämin. Adsorbiert man an Metazinnsäure, so bleibt die Oxydase-Wirkung des Hämins praktisch unverändert.

Es gelingt also auch, die Sauerstoff-Übertragung⁷⁾ durch Adsorption des Hämins wesentlich zu verändern. Von den Adsorptionsmitteln wirken jedoch — an Katalase- und an Oxydase-Wirkung gemessen — nur Faser-Tonerde und Metazinnsäure gleichsinnig. Der Wasserstoffperoxyd-Aktivierung steht die Hemmung der Sauerstoff-Übertragung durch Kohle entgegen.

Adsorbens	H_2O_2 -Zersetzung	O_2 -Übertragung
Kohle	Aktivierung	Hemmung
Faser-Tonerde	Hemmung	Hemmung
Metazinnsäure	Kein Einfluß	Kein Einfluß

IV. In keinem Falle war während der Reaktion eine Ablösung des Hämins von den Adsorbentien festzustellen. Dennoch scheinen die angeführten Beobachtungen mit der Eluierbarkeit der einzelnen Adsorbate irgendwie zusammenzuhängen, denn das Zinnsäure-Adsorbat, das in den katalytischen Wirkungen mit freiem Hämin so nahe übereinstimmt, ist überaus leicht (z. B. durch 2,5% Pyridin) eluierbar, während Kohle- und Tonerde-Adsorbat unter denselben Bedingungen keinen Farbstoff abgeben. Von der Tonerde läßt sich immerhin das Hämin durch Sekundärphosphat noch in Lösung bringen. Eine Zerlegung der Kohle-Adsorbate, in denen die katalytischen Wirkungen am stärksten verändert sind, ist uns noch auf keine Weise gelungen.

V. Die Beobachtungen gelten zunächst nur für die im Versuchs-Teil angegebenen Bedingungen und sollen unter Abänderung der Temperatur, der Acidität und der Konzentrations-Verhältnisse ergänzt werden. Auch beabsichtigen wir, die Zahl der Adsorptionsmittel und der komplexen Metallverbindungen als Katalysatoren zu erhöhen, und auch die Peroxydase-Eigenschaften mit in den Kreis der Untersuchung zu ziehen. In theoretischer Hinsicht bleibt vor allem zu prüfen, wie weit die Affinitäten des Hämins, gemessen an der Dissoziationskonstanten der Hydroperoxyd-Verbindung⁸⁾, sich bei der Bildung der Adsorbate verschieben, und wie weit die spezifischen Umsatzgeschwindigkeiten der Reaktions-Zwischenprodukte dabei Änderungen erfahren.

⁶⁾ Biochem. Journ. 18, 225 [1924].

⁷⁾ Versuche, mit Hämin Sauerstoff auf Leucin und Fructose zu übertragen, sind negativ verlaufen und im Versuchsteil beschrieben.

⁸⁾ H. v. Euler und K. Josephson, A. 456, 111 [1927].

Beim zahlenmäßigen Vergleich der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, daß in den Katalase-Versuchen das Hämin durch Hydroperoxyd angegriffen wird⁹⁾. Es liegen Anhaltspunkte dafür vor, daß diese Schädigung in den einzelnen Adsorbaten verschieden ist. p_{H^+} -Änderungen in den Phasen-Grenzflächen könnten teilweise am Zustandekommen der gefundenen Effekte beteiligt sein¹⁰⁾.

Der zeitliche Verlauf der H_2O_2 -Katalysen läßt deutlich zwei verschiedene Reaktionsphasen erkennen. In den ersten Augenblicken beobachtet man in der Regel einen Reaktionsstoß¹¹⁾ (α -Aktivität nach J. B. First und F. S. Watson¹²⁾), der im allgemeinen nicht weiter berücksichtigt wurde. Er findet sich in den Versuchen mit Hämin-Adsorbaten, sowie ihn J. B. First und F. S. Watson bei der H_2O_2 -Zersetzung durch Kohlen geschildert haben. Unsere Angaben beziehen sich alle auf die nach 1—2 Min. einsetzende, langsamer und stetig verlaufende H_2O_2 -Katalyse (β -Aktivität).

In Anbetracht der angeführten Umstände erscheint es verfrüht, den Versuch einer Theorie der katalytischen Wirkungen des Hämins in seinen Adsorbaten zu wagen. Vielleicht wird es nach Beibringung weiteren experimentellen Materials möglich werden, Beziehungen zum räumlichen Bau der Adsorptionsschichten aufzudecken. Der nach kurzer Zeit zu beobachtende Verlust der Katalase-Wirkung im Tonerde-Adsorbat legt den Gedanken nahe, daß im Hämoglobin, das bekanntlich H_2O_2 nicht zersetzt¹³⁾, die prosthetische Gruppe, durch Bindung an basische Gruppen des Globins, in ähnlicher Art verändert wird. Als Oxydase stimmt Hämin-Tonerde mit freiem Hämin der Größenordnung nach überein (Substrat: Leinöl), was dazu paßt, daß nach M. E. Robinson¹⁴⁾ sich auch Hämoglobin und Hämin bei der Leinöl-Oxydation ähnlich verhalten.

VI. O. Warburg und W. Brefeld führen in ihrer Arbeit „Über die Aktivierung stickstoffhaltiger Kohlen durch Eisen“¹⁵⁾ deren Fähigkeit, molekularen Sauerstoff auf adsorbierte Amino-säuren zu übertragen, zurück auf Eisen, das in die Oberfläche der Kohle „eingebettet“ ist.¹⁶⁾ Wird Eisen-

⁹⁾ R. Kuhn und L. Brann, B. **59**, 2370, u. zw. 2379 [1926].

¹⁰⁾ Zum gegenwärtigen Stand unserer Kenntnisse von der hydrolytischen Adsorption vergl. z. B. J. M. Kolthoff, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **46**, 549 [1927]. Ferner L. Michaelis und P. Rona, Biochem. Ztschr. **97**, 57 [1921], E. J. Miller und F. E. Bartell, Journ. Amer. chem. Soc. **45**, 1106 [1923], J. R. Parks und P. G. Bartlett, Journ. Amer. chem. Soc. **49**, 1698 [1927]. „Über die Adsorption von Komplexsalzen“ vergl. N. Schilow und B. Nekrassow, Ztschr. physikal. Chem. **118**, 79 [1925]; vergl. auch L. de Bronchère, Bull. Acad. Roy. Belg. **13**, 827 [1927].

¹¹⁾ H. Wieland und W. Franke, „Über den Mechanismus der Oxydationsvorgänge“, A. **457**, 1, u. zw. S. 5 [1927].

¹²⁾ „Catalytic Decomposition of Hydrogen-Peroxide by Blood Charcoal“, Transact. Farad. Soc. **19**, 601 [1923/24]. Dortselbst weitere Literatur über den Einfluß der Kohlen auf die H_2O_2 -Zersetzung.

¹³⁾ G. Senter, Ztschr. physikal. Chem. **44**, 257 [1903]; R. Willstätter und A. Madinaveitia (Promotions-Arbeit von A. Madinaveitia), Zürich 1912.

¹⁴⁾ l. c.

¹⁵⁾ Biochem. Ztschr. **145**, 461 [1924], vergl. auch Biochem. Ztschr. **119**, 134 [1921], Ztschr. Elektrochem. **70** [1922], Biochem. Ztschr. **136** 266 [1923].

¹⁶⁾ vergl. auch E. K. Rideal und W. M. Wright, Journ. chem. Soc. London **127**, 1347 [1925], **128**, 1819, 3182 [1926].

chlorid an Kohle adsorbiert, so ist nach einem Versuch O. Warburgs mit Cystin die Sauerstoff-Übertragung auffallenderweise geringer als durch die Kohle allein¹⁷⁾.

Auch für die H_2O_2 -Katalyse ist es entscheidend, ob man das Eisen (z. B. durch Verglühen von Zucker-Eisensalz) in die Kohle „einbettet“, oder ob man das Eisen aus der Lösung eines Eisensalzes adsorbiert. Im ersten Falle findet nach J. B. First und F. S. Watson, eine gewisse Beschleunigung der H_2O_2 -Zersetzung statt, im zweiten Falle aber keine Hemmung, wie man nach den Ergebnissen der Cystin-Oxydation hätte erwarten können. Wir haben im Gegenteil gefunden, daß das Eisen-Kohle-Adsorbat Hydroperoxyd stürmisch zersetzt. Seine Aktivität übertrifft, auf gleiche Eisenmengen bezogen, die der eisenhaltigen Kohlen von J. B. First und F. S. Watson um Größenordnungen.

In der folgenden Gegenüberstellung wird die H_2O_2 -Katalyse der beiden Eisen-Kohle-Systeme verglichen mit derjenigen der Kohle ohne Zusatz von Eisen. Bei der O_2 -Übertragung bezieht sich die Hemmung durch Adsorption (O. Warburg) auf Kohle, die an sich wirksam war und bereits „eingebettetes“ Eisen enthielt.

Zustand des Eisens	H_2O_2 -Zersetzung	O_2 -Übertragung
Adsorption	Enorme Aktivierung	Hemmung
„Einbettung“	Aktivierung	Aktivierung

Weiter oben wurde bereits gezeigt, daß Hämin an Kohle als Katalase aktiviert, als Oxydase aber gehemmt wird.

Adsorbiert man Eisenchlorid an Faser-Tonerde, so erlischt die Katalase-Wirkung¹⁸⁾. An Metazinnssäure beobachtet man starke Hemmung.

VII. Ob die Hydroperoxyd-Katalyse durch Eisensalze eine Eigenschaft der Ferro- oder der Ferri-Ionen darstellt, ist in der Literatur schon vielfach erörtert worden¹⁹⁾. L. van Bohnson und A. C. Robertson²⁰⁾ kommen auf Grund einer Kritik früherer Versuche und eigener Beobachtungen zu dem Ergebnis, daß Ferrosalz mit Hydroperoxyd nicht koexistenzfähig sei²¹⁾. Wir glauben nun zeigen zu können, daß trotzdem unter geeigneten Bedingungen, nämlich an Kohle, die Ferrostufe neben H_2O_2 bestehen kann, und sind geneigt die von uns beobachtete Aktivierung der H_2O_2 -Katalyse durch Eisen(III)-chlorid nach Adsorption an Kohle auf eine an der Phasengrenzfläche sich vollziehende Reduktion zu Ferrosalz zurückzuführen.

Schüttelt man nämlich eine Lösung von Ferrichlorid mit Kohle, so daß nicht alles Eisen absorbiert wird, so gibt die Lösung nach Abzentrifugieren des Adsorbats mit Ferricyankalium deutliche Berliner Blau-Reaktion.

¹⁷⁾ Biochem. Ztschr. **119**, 134 [1921], u. zw. S. 166.

¹⁸⁾ vergl. dazu den Befund von L. van Bohnson, Journ. physical. Chem. **25**, 19 [1921], daß auch Eisenhydroxyd verhältnismäßig schwach katalytisch wirksam ist.

¹⁹⁾ J. Brode, Ztschr. physikal. Chem. **37**, 257 [1901], F. Röhmman und T. Shamine, Biochem. Ztschr. **42**, 235 [1912], M. Madelung, Ztschr. physiol. Chem. **71**, 204 [1911], G. Pellini und O. Meneghini, Ztschr. anorgan. Chem. **62**, 203 [1909], H. W. Fischer und E. Brieger, Ztschr. physikal. Chem. **78**, 582 [1912], St. Bertalan, Ztschr. physikal. Chem. **95**, 328 [1920], L. Karczag, Biochem. Ztschr. **119**, 16 [1921]. Für peroxydatische Reaktionen haben H. Wieland und W. Franke, A. **457**, 1 [1927], besonders scharf die Überlegenheit der Ferro- vor den Ferriverbindungen hervorgehoben.

²⁰⁾ Journ. Amer. chem. Soc. **45**, 2493 u. zw. 2499 [1923], dortselbst auch weitere Literatur zu Fußnote 19.

²¹⁾ In einer vor kurzem erschienenen Mitteilung haben jedoch W. Manchot und L. Lehmann, A. **460**, 179 [1927/28], u. zw. S. 188 ff., den Nachweis geführt, daß konzentriertes Hydroperoxyd sogar Ferri-Salz zu Ferrosalz reduzieren kann.

Es gelang allerdings nicht, bei gleichzeitiger Gegenwart von Hydroperoxyd Ferro-Salz in Lösung nachzuweisen. Bekanntlich²²⁾ entsteht nämlich aus Ferri-Salz und Ferri-Cyankalium bei Anwesenheit von H_2O_2 , unter den Bedingungen unserer Versuche, Berliner Blau, da H_2O_2 mit Ferri-Cyankalium unter Bildung von Ferrocyanid reagiert. Wir halten es für wahrscheinlich, daß bei Gegenwart von H_2O_2 die Ferro-Stufe nur an der Phasen-Grenze, nicht aber in Lösung existiert. Vermutlich ist das adsorbierte Ferro-Salz in seinem Energie-Inhalt, und daher auch in seiner katalytischen Wirkung, vom Ferro-Ion in Lösung erheblich verschieden.

Schon N. Schilow und L. Lepin²³⁾ geben (ohne die Versuchsbedingungen und die Art des Nachweises mitzuteilen) an, eine glatte Reduktion von Ferrichlorid an Kohle erzielt zu haben. Diese Beobachtung erinnert an die von D. Avery²⁴⁾ entdeckte Reduktion von Gold(III)-Chlorid zu metallischem Gold und an die Reduktion von Sublimat zu Kalomel, von Silbernitrat zu Silber und von Goldchlorid zu Gold, die erst vor kurzem O. Ruff, F. Ebert und F. Luft²⁵⁾ bei der Adsorption an Kohle durch Titration und Röntgen-Aufnahmen nachgewiesen haben.

In den Untersuchungen über die H_2O_2 -Katalyse durch kolloidale Metalle hat G. Bredig²⁶⁾ mit seinen Schülern wichtige Anhaltspunkte dafür gewonnen, daß Peroxyde bzw. Peroxyd-Hydrate als Reaktions-Zwischenprodukte auftreten²⁷⁾; im Falle der Quecksilber-Katalyse ist es G. Bredig (und A. v. Antropoff)²⁸⁾ sogar gelungen, das Peroxyd HgO_2 zu isolieren.

Nachdem nun nach W. Manchot (und O. Wilhelms)²⁷⁾ „allgemein Ferro-Verbindungen schneller peroxydiert werden als Ferri-Verbindungen unter gleichen Bedingungen“ wird die starke Aktivierung der H_2O_2 -Zersetzung durch Eisensalz an Kohle verständlich, und man darf wohl in unseren Versuchen eine weitere Stütze für die theoretischen Vorstellungen von W. Manchot über Peroxyd-Bildung beim Eisen erblicken.

Wir sind damit beschäftigt, unter diesem Gesichtspunkt auch die Peroxydase-Eigenschaften der Eisen-Kohle-Systeme zu prüfen.

VIII. Die Entdeckung von O. Warburg, daß das Adsorptions-Spektrum des Kohlenoxyd-Hämins sehr nahe mit demjenigen der Kohlenoxyd-Verbindung des „Atmungsferments“ in *Torula utilis* übereinstimmt³⁰⁾, verleiht den Untersuchungen über Häminkatalysen unerwartetes biologisches Interesse. Die bisher erforschten Sauerstoff-Übertragungen durch Häminkatalysen und ähnliche Blutfarbstoff-Derivate sind allerdings so gering, daß

²²⁾ vergl. z. B. W. Manchot (u. O. Wilhelms), A. **325**, 105 [1902], u. zw. S. 121.

²³⁾ Zitiert nach N. Schilow und B. Nekrassow, Ztschr. physikal. Chem. **118** 79 [1924], u. zw. S. 87. Diese Autoren haben auch Reduktion von Kobaltsalzen an Kohle beobachtet.

²⁴⁾ Journ. Soc. chem. Ind. **27**, 255 [1908].

²⁵⁾ Ztschr. anorgan. Chem. **170**, 49 [1928].

²⁶⁾ vergl. z. B. Biochem. Ztschr. **6**, 283, u. zw. 312 [1907]; ferner L. Bredig und R. Müller v. Berneck, Ztschr. physikal. Chem. **31**, 258 [1900].

²⁷⁾ vergl. dazu W. Manchot (u. O. Wilhelms), A. **325**, 105 [1902]. Weitere Literatur siehe die zitierte Arbeit von W. Manchot und L. Lehmann, u. zw. S. 179, Fußnote.

²⁸⁾ Ztschr. Elektrochem. **12**, 585 [1906].

²⁹⁾ A. **325**, l. c., u. zw. S. 123; siehe auch W. Manchot und L. Lehmann, l. c.

³⁰⁾ O. Warburg und E. Negelein, Biochem. Ztschr. **193**, 339 [1928], u. zw. S. 343. Fußnote ferner O. Warburg Ztschr. angew. Chem. **41**, 265 [1928] und Naturwiss. **16**, 345 [1928].

man das Hämin nicht gerne als „Atmungsferment“ bezeichnen möchte. Die vorliegende Abhandlung zeigt jedoch, wie stark durch besondere Bindungsweise das Hämin in seinen katalytischen Wirkungen modifiziert werden kann, und so liegt die Vermutung nahe, daß auch in den Zellen die durch das Absorptionsspektrum nachgewiesene Eisenkomplexverbindung, an welcher sich die Atmung abspielt, einem bestimmten Adsorptionszustande ihre Aktivität verdankt.

„Die Zellatmung ist“ nach O. Warburg³¹⁾ „ein capillarchemischer Vorgang der an den eisenhaltigen Oberflächen der festen Zellbestandteile abläuft. Durch Adsorption an diesen Oberflächen werden die trägen organischen Verbindungen aus dem gleichen Grunde gegenüber Sauerstoff reaktionsfähig, wie die Amino-säuren an der Oberfläche der Blutkohle.“ Unsere Versuche deuten darauf hin, daß neben der Adsorption der Brennstoffe im Sinne O. Warburgs der Adsorptionszustand der eisenhaltigen Katalysatoren in der Zelle, für die Atmungsvorgänge von Bedeutung sein kann.^{31a)}

Beschreibung der Versuche.

Methodik.

Die H_2O_2 -Zersetzung und O_2 -Übertragung wurde gasvolumetrisch verfolgt. Die Reaktionsgefäße hatten die in Fig. 1 (S. 1559) abgebildete Form. Der seitliche Ansatz wurde entweder mit Hydroperoxyd³²⁾ oder mit dem Substrat der Oxydase-Reaktion (z. B. Leinöl) beschickt, während das Hauptgefäß das in Pufferlösung suspendierte Adsorbat enthielt. Die Versuche wurden bei konstanter künstlicher Beleuchtung und konstanter Schüttelgeschwindigkeit (130 Touren pro Min.) in der Schüttelmaschine nach W. Steinkopf und H. Winternitz³³⁾ ausgeführt. Die entwickelte bzw. adsorbierte O_2 -Menge wurde in einer 50-ccm-Gasbürette abgelesen. Durch den mit festem Ätzkali beschickten Kugelsatz war für die Absorption etwa entstehender Kohlensäure gesorgt. Sämtliche Versuche wurden bei Zimmer-Temperatur ausgeführt, die während der Dauer der Versuche auf $\pm 0.3^{\circ}$ konstant war³⁴⁾. In den Katalase-Versuchen wurde, nach Abzentrifugieren des Absorbates, das noch vorhandene Hydroperoxyd mit $n/10$ - $KMnO_4$ titriert: man erhielt durchwegs die erwartete Übereinstimmung mit den gasvolumetrischen Bestimmungen. Die bei den Katalase-Versuchen in Betracht kommende Löslichkeit des Sauerstoffs in dem mit Luft gesättigten Wasser und die Adsorption desselben durch die Hämin-Adsorbate kann in der beobachteten α -Aktivität zur Geltung kommen. Bei den oxydatischen Katalysen stellt sich nach Zugabe des Substrates das Adsorptions-Gleichgewicht nicht momentan ein. Die angeführten Gründe bestimmten uns, die ersten 10 Min. in denen die α -Aktivität vorherrscht (sie ist in der Regel schon nach 1—2

³¹⁾ „Über die katalytischen Wirkungen der lebendigen Substanz“, Berlin 1928, S. 108; vergl. auch S. 125.

^{31a)} vergl. dazu auch O. Warburg, Naturwiss. 16, 345 [1928].

³²⁾ „Chemisch reines Perhydrol“, E. Merck. ³³⁾ Chem.-Ztg. 37, 40 [1913].

³⁴⁾ Bei den Oxydase-Versuchen fallen, wegen des kleineren Umsatzes, trotzdem die Reaktionsgefäße hier natürlich kleiner sind, die durch Temperatur-Schwankungen bedingten Unsicherheiten mehr ins Gewicht. Es wurde durch Kontrollversuche beobachtet, daß die Temperatur-Schwankungen maximale Volumänderungen von 0.3 ccm ausmachten.

Min. abgeklungen) bei allen kinetischen Vergleichen außer acht zu lassen. Ein Vergleich der β -Aktivitäten verlangt die vollständige Kenntnis der Zeit-Umsatzkurven, der Vergleich von Stunden-Werten wäre unzureichend. Bei den H_2O_2 -Katalysen wurde neben dem Hämin-Adsorbat die Wirkung des Adsorbens allein und des Hämins allein ermittelt. Eine Adsorption von Hydroperoxyd an Kohle, Faser-Tonerde oder Metazinnssäure war analytisch (Titration mit $n/10$ - $KMnO_4$) nicht nachzuweisen.

Bei den Oxydationen mit molekularem Sauerstoff wurden neben den Wirkungen der Hämin-Adsorbate einzeln bestimmt: 1. Hämin+Substrat+Puffer (ohne Adsorbens), 2. Adsorbens+Substrat+Puffer (ohne Hämin), 3. Hämin+Adsorbens+Puffer (ohne Substrat).

Adsorptionsverhalten des Hämins.

Angewandt wurden Hämin-Lösungen, die 1 mg Farbstoff in 1 ccm $m/50$ - Na_2HPO_4 („für Enzym-Studien“ nach S. P. L. Sörensen) enthielten. Diese Lösungen werden im Folgenden als „Phosphat-Hämin“ bezeichnet. Für die H_2O_2 -Katalyse diente ein Präparat von α -Chlor-Hämin aus Schweineblut nach M. Schalfjeff, das nach der Chinin-Methode umkrystallisiert war, für die Oxydase-Versuche ein analog aus Rinderblut gewonnenes Präparat. Für Adsorptionsversuche, nicht für katalytische Versuche, wurde das zweite Hämin auch in 2,5% Pyridin gelöst. Die Lösung enthielt ebenfalls pro ccm 1 mg Farbstoff. Wir bezeichnen sie im Folgenden als „Pyridin Hämin“.

Als Adsorptionsmittel dienten: 1. Carbo medicinalis puriss. E. Merck, bekanntlich eine ausgezeichnet adsorbierende Kohle. Eine Stunde mit Wasser geschüttelt, gibt sie weder Säure noch Lauge ab. 0.5 g, mit 2.5 ccm Phosphat- oder Pyridin-Hämin geschüttelt, bewirken vollständige Entfärbung. Fügt man zu den 2.5 ccm Phosphat-Hämin noch 0.8 ccm $m/4$ -Phosphat zu, so findet ebenfalls quantitative Adsorption statt. Schüttelt man 1 g des lufttrockenen Adsorbates mit 10 ccm reinem Pyridin, so wird keine Spur des Hämins herausgelöst. Verwendet man statt des Pyridins 10 ccm $m/4$ -sek.-Phosphat oder 0,5-n. NaOH, so erfolgt ebenso wenig Elution.

Führt man die Versuche statt mit Kohle-Phosphat-Hämin, mit Kohle-Pyridin-Hämin aus, so läßt sich ebenso wenig eine Herauslösung erzielen.

Die Kohle nimmt in Übereinstimmung mit L. Michaelis und P. Rona³⁵, sowie in Übereinstimmung mit O. Warburg³⁶, keine meßbare Menge Sauerstoff auf. Sie wurde deshalb für alle oxydatischen Versuche direkt verwendet. Da sie aber 0.01-n. Lösungen von H_2O_2 bereits meßbar zersetzt, wurde sie für die Katalase-Versuche nach der Methode von E. J. Miller³⁷ gereinigt. Zu diesem Zweck wurde sie mit einem Gemisch von 1 Tl. 35-proz. Flußsäure (C. A. F. Kahlbaum „zur Analyse“ und 3 Tln. 5-proz. Salzsäure unter ständiger Erneuerung des Säure-Gemisches 3 Tage abgeraucht. Dann wurde die Kohle mit heißem Wasser so lange gewaschen, bis im Filtrat kein Chlor-Ion nachweisbar war, zunächst über KOH im Vakuum bei gewöhnlicher Temperatur und zuletzt bei 120° konstant getrocknet. Asche 4.4%, Feuchtigkeit 0.1%. Diese Kohle war unter den unten beschriebenen Bedingungen ohne meßbare Wirkung auf 0.02-n. Lösungen von H_2O_2 , 2-n. Lösungen wurden ein wenig zersetzt. Das Adsorptionsverhalten gegen Hämin ist ähnlich dem der ungereinigten Kohle.

³⁵) Biochem. Ztschr. **16**, 489 [1909].

³⁶) „Über die katalytischen Wirkungen der lebendigen Substanz“, I. c., S. 122.

³⁷) Journ. physical. Chem. **30**, 1131 [1926].

2. Aluminiumoxyd (Faser-Tonerde) „für quantitat. Adsorptions-Analyse nach H. Wislicenus“³⁸⁾ E. Merck. Schüttelt man 2 Stdn. mit viel Wasser, so wird weder Säure noch Lauge an dasselbe abgegeben. Unter allen unten beschriebenen Versuchsbedingungen ist das Adsorbens ohne meßbare Wirkung auf H_2O_2 . Bei der Adsorption des Hämins ist es von Wichtigkeit, ob der Farbstoff in Phosphat- oder Pyridin-Lösung verwendet wird. 2.5 ccm Pyridin-Hämin werden durch 0.03 g Tonerde vollkommen entfärbt. Wird das abzentrifugierte Adsorbat mit $m_{4\text{-sek.}}$ -Phosphat geschüttelt, so geht das Hämin fast vollständig wieder in Lösung. Schüttelt man das Adsorbat mit 5 ccm Pyridin, so erfolgt dagegen keine Elution. Viel schlechter als aus Pyridin wird der Farbstoff aus Phosphat-Lösung absorbiert. 2.5 ccm Phosphat-Hämin + 0.8 ccm $m_{4\text{-sek.}}$ -Phosphat verlangen zur vollständigen Adsorption 0.6 g Tonerde³⁹⁾. Etwas besser wird aus weniger alkalischer Lösung adsorbiert: 2.5 ccm Phosphat-Hämin + 10 ccm $m_{5\text{-prim.}}$ -K-Phosphat werden durch 0.1 g Tonerde restlos aufgenommen. Das Elutionsverhalten des Tonerde-Phosphat-Hämins ist dem des oben beschriebenen Tonerde-Pyridin-Hämins ähnlich.

Wir haben auch noch die Adsorption von Pyridin-Hämin an β -Aluminium-Hydroxyd nach R. Willstätter und H. Kraut⁴⁰⁾ untersucht und gefunden, das es noch besser adsorbiert als die Faser-Tonerde.

3. Silica-Gel (Borsig): 2 ccm Phosphat-Hämin + 0.4 g des Adsorbens + 3 ccm $m_{5\text{-prim.}}$ -K-Phosphat lassen keine meßbare Adsorption erkennen.

4. „Kieselsäure-Hydrat“ (B. Siegfried, Zofingen): 2 ccm Pyridin-Hämin + 0.1 g des Adsorbens + 4 ccm $m_{5\text{-prim.}}$ -K-Phosphat werden nicht entfärbt. 2 ccm Phosphat-Hämin + 0.4 g des Adsorbens + 3 ccm $m_{5\text{-prim.}}$ -K-Phosphat lassen ebenfalls keine Adsorption erkennen.

5. Zinnsäure (B. Siegfried, Zofingen): 0.2 g des Adsorbens + 2 ccm Phosphat-Hämin (oder Pyridin-Hämin) + 3 ccm $m_{5\text{-prim.}}$ -K-Phosphat hinterlassen nach dem Abzentrifugieren eine stark gefärbte Lösung.

6. Metazinnsäure (B. Siegfried, Zofingen): 0.2 g des Adsorbens + 2 ccm Pyridin-Hämin + 3 ccm $m_{5\text{-prim.}}$ -K-Phosphat bewirken keine bedeutende Adsorption des Farbstoffes. Dagegen werden 2 ccm Phosphat-Hämin durch 0.3 g des Adsorbens in 4 ccm $m_{5\text{-prim.}}$ -K-Phosphat vollständig entfärbt. Ebenso fanden wir quantitative Adsorption, wenn 2.5 ccm Phosphat-Hämin + 0.5 g des Adsorbens in 0.8 ccm $m_{4\text{-sek.}}$ -Phosphat geschüttelt wurden. Wird das Phosphat-Hämin-Metazinnsäure-Adsorbat mit 2.5% Pyridin 1 Min. geschüttelt, so tritt vollständige Elution ein. Auch wenn man 0.5 g des Adsorbates mit 10 ccm $m_{4\text{-sek.}}$ -Phosphat digeriert, erfolgt beträchtliche Herauslösung. Unter allen unten beschriebenen Bedingungen ist Metazinnsäure ohne merkbare Einwirkung auf H_2O_2 .

Auf Grund dieser Beobachtungen haben wir alle folgenden katalytischen Versuche mit Phosphat-Hämin ausgeführt und die folgenden Adsorbenzien verwendet:

³⁸⁾ Kolloid-Ztschr. **6**, 222 [1910], Ztschr. chem. Ind. Kolloide **2**, 11 [1908].

³⁹⁾ In diesem Fall ist die über dem abzentrifugierten Niederschlag stehende Flüssigkeit nicht ganz farblos, sondern schwach hellgelb gefärbt; auch durch weitere Erhöhung der Tonerde-Menge bleibt diese schwache Farbe bestehen.

⁴⁰⁾ vergl. z. B. R. Willstätter, H. Kraut und O. Erbacher, B. **58**, 2448 [1925], u. zwar S. 2451 ff.

1. Die beiden Kohlen, 2. die Faser-Tonerde, 3. die Metazinnsäure.

Hr. C. Seyffert hatte die Freundlichkeit, die Absorptionsbanden des Phosphat-Hämin-Tonerde- bzw. Metazinnsäure-Adsorbates mit denen von Phosphat-Hämin in Lösung zu vergleichen. Zunächst wurde Phosphat-Hämin mit Wasser verdünnt und ein Tropfen Hydrazin-Hydrat zugefügt.

I 546 $\mu\mu$ II 515 $\mu\mu$

Verwendet man an Stelle des Phosphat-Hämins das Tonerde-Adsorbat und fügt einen Tropfen Hydrazin-Hydrat hinzu, so beobachtet man, so wie beim Hämin in Lösung, eine leichte Rotfärbung. Daß keine Elution stattfindet, beweist man durch Abzentrifugieren. Die überstehende Flüssigkeit ist ganz farblos. Man mußte hier wegen Licht-Zerstreuung der Suspension mit größerer Spaltweite ablesen:

I 547 $\mu\mu$ II 516 $\mu\mu$

Ganz ähnlich wurde das Metazinnsäure-Adsorbat untersucht, das etwas schärfere Ablesungen gestattete:

I 546 $\mu\mu$ II 515 $\mu\mu$

Die Adsorptions-Eigenschaften und die Eluierbarkeit des Pyridin- und Phosphat-Hämins sind aus der folgenden Zusammenstellung ersichtlich.

Adsorptionsverhalten.

	Kohle	Faser-Tonerde	Metazinnsäure
Phosphat-Hämin	+ +	+	+
Pyridin-Hämin	+ +	+ +	—

Elutionsverhalten der Phosphat-(Pyridin-)Hämin-Adsorbate.

	2.5 % Pyridin	reines Pyridin	$m/4$ -sek.-Phosphat
Kohle-Adsorbat	—	—	—
Tonerde-Adsorbat	—	—	+
Metazinnsäure-Adsorbat ...	+ +	+ +	+

Schließlich haben wir versucht, das Adsorptions-Gleichgewicht des Hämins durch oberflächen-aktive Stoffe zu verschieben. Wir verwendeten künftlichen Amylalkohol und Urethan. 1. Metazinnsäure-Phosphat-Hämin: 6.25 ccm Phosphat-Hämin + 2 ccm $m/4$ -sek.-Phosphat werden durch 1.7 g Metazinnsäure entfärbt. Fügt man 0.5 ccm Amylalkohol oder 0.1 g Urethan zu, so ändert das nichts. Verwendet man nur 1 g Metazinnsäure, so ist die Adsorption nicht vollständig. Nach Einstellung des Gleichgewichtes, wird die Farbe der über dem abzentrifugierten Niederschlag stehenden Flüssigkeit verglichen mit einem Parallelversuch, dem vorher 0.1 g Urethan bzw. 0.5 ccm Amylalkohol zugefügt waren. Es ließ sich kein Unterschied feststellen.

2. Bringt man je 0.01 g Tonerde mit 2.5 ccm Phosphat-Hämin ins Gleichgewicht, so ist die über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit gefärbt. Vergleich mit Parallelversuchen, denen wie oben 0.1 g Urethan

oder 0.5 ccm Amylalkohol zugesetzt waren, ließen keine Verschiedenheiten erkennen.

H₂O₂-Katalysen.

A. Hämin.

Im Hauptgefäß (Fig. 1) befanden sich jeweils 2.5 ccm Phosphat-Hämin (in den Kontrollversuchen statt dessen 2.5 ccm $m/_{50}$ -sek.-Natriumphosphat) + 10 ccm $m/_{5}$ -prim. K-Phosphat + 150 ccm Wasser. In das Ansatzrohr kamen 10 ccm 0.33-n. Hydroperoxyd. Das Reaktionsgemisch ist demnach 0.019-n. an H₂O₂, so daß bei vollständiger Zersetzung 18.5 ccm Sauerstoff von 0° und 760 mm (= 20.5 ccm bei 14° und 718 mm) entstehen konnten. Das Gesamt-Reaktionsvolumen betrug 172.5 ccm. Zur Einstellung der Adsorptions-Gleichgewichte wurde (auch bei den Oxydase-Versuchen) das Hämin mit dem Adsorbens im Hauptgefäß $1/2$ Stde. geschüttelt⁴¹⁾.

Als Beispiel für die Reproduzierbarkeit der Messungen führen wir die beiden Versuche der Fig. 2 (S. 1561) an, in denen das Hämin an je 0.5 g Tonerde adsorbiert war.

Daß die Wirksamkeit von der Menge des angewandten Adsorptionsmittels nicht merklich abhängt, ist aus den Figuren 3 und 4 ersichtlich.

Entsprechende Versuche wurden mit Metazinnsäure-Adsorbaten ausgeführt, wobei nach Ablauf von 65 Min. ($t = 16^{\circ}$) das noch vorhandene H₂O₂ titriert wurde. Mit 0.38 g Metazinnsäure + 2.5 mg Hämin betrug die H₂O₂-Abnahme 9.0 ccm $n/_{10}$ -KMnO₄, mit 0.51 g Metazinnsäure und derselben Katalysatormenge 8.9 ccm $n/_{10}$ -KMnO₄, was einer Zersetzung von 80.8 % und 79.4 % entspricht.

In Fig. 5 vergleichen wir die H₂O₂-Katalyse durch Hämin in Lösung mit derjenigen der Adsorbate an Kohle, Metazinn Säure und Faser-Tonerde. Der Versuch mit gelöstem Hämin ist ebenfalls unter Schütteln (und sonst gleichen Bedingungen) ausgeführt, da auch ohne Adsorbens die Aktivität des Hämins stark von der Geschwindigkeit des Schüttelns abhängt.

Durch Extrapolation der Anfangs-Geschwindigkeiten (Ursprungs-Tangenten unter Vernachlässigung der ersten 10 Min.) ergibt sich, daß 1 mg Hämin (Fe = 8.5%) in 60 Min. bei p_H ca. 5 ($m/_{5}$ -prim.-K-Phosphat), bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 130 Touren pro Min. aus 69 ccm einer 0.019-n. H₂O₂-Lösung folgende Sauerstoffmengen erzeugt:

In Lösung: 3000 ccm (16° , 722 mm). An Metazinn Säure: 3000 ccm (15° , 722 mm).
An Kohle: 8400 ccm (16° 725 mm). An Faser-Tonerde: starke Hemmung.

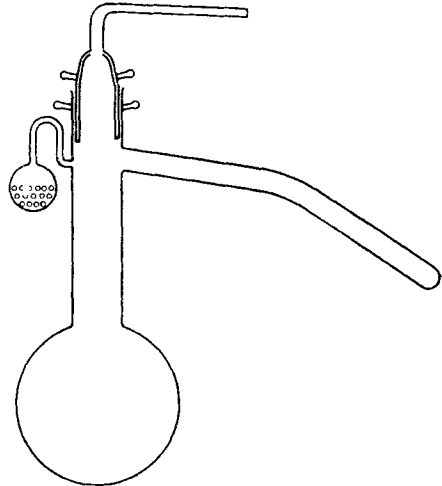


Fig. 1.

⁴¹⁾ Schüttelt man die Tonerde-Adsorbate länger (z. B. 10 Stdn.), so ändert das nichts.

Von einem kinetischen Vergleich mit dem Tonerde-Adsorbat wollen wir absehen. Wie aus Fig. 2, 4 und 5 ersichtlich ist, findet immerhin während des ersten Zeitintervalls merkliche H_2O_2 -Zerstörung statt. Der spätere Stillstand ist nicht auf vollständige Zerstörung des Hämins zurückzuführen, da auch nach Einwirkung des H_2O_2 Hämin in unverändertem Zustand (Kontrolle durch spektroskopischen Befund) durch sek.-Phosphat eluiert werden kann.

Im folgenden Versuch, Fig. 6, haben wir die Schädigung des Hämins durch H_2O_2 im Hämin-Kohle-Adsorbat bestimmt (Vergleichsversuche mit den anderen Adsorbaten oder mit Hämin in Lösung haben wir nicht ausgeführt). Zunächst wurde die H_2O_2 -Zersetzung (Fig. 3) durch Hämin + 0.5 g Kohle wie gewöhnlich beobachtet (Kurve I) und nach 126 Min. (79,4 % Umsatz) nochmals die ursprünglich vorhandene H_2O_2 -Menge zugesetzt, so daß nunmehr das Reaktionsvolumen 185.5 cm beträgt und die Lösung 0.022-n im Bezug auf H_2O_2 ist (Kurve II). Man findet, wieder an den Ursprungstangenten wie oben gemessen, die Aktivität um etwa 30 % erniedrigt.

Bei höherer Temperatur (30°) und größerer H_2O_2 -Konzentration (0.11-n.) bei einem Reaktionsvolumen von 45 ccm und bei sonst gleichen Bedingungen ist (Fig. 7) die Inaktivierung noch stärker.

In Fig. 7 (der entwickelte Sauerstoff wurde bei 15° und 723 mm aufgefangen) ist die relative Lage der horizontalen Kurven-Äste⁴²⁾ zum Teil durch die Verschiedenheit der α -Aktivitäten bedingt. Jedoch kann daraus kein Maß für dieselben abgeleitet werden, da, wie erörtert, auch andere Effekte in die Kinetik der ersten Minuten eingehen. Die geringste Schwächung der β -Aktivität erleidet das Hämin im Adsorbat an Kohle.

B. Eisen(III)-chlorid.

I. Im Hauptraum der Fig. 1 befanden sich 0.05 g Kohle + 8 mg FeCl_3 , 6 H_2O ⁴³⁾ + 8 mg H_2SO_4 in 25 ccm H_2O . Zugekippt wurden 5 ccm 1.8-n. H_2O_2 -Lösung. Das Reaktionsvolumen betrug also 30 ccm und war in bezug auf H_2O_2 0.30-n., entsprechend 49.8 ccm O_2 von 0° und 760 mm, in bezug auf Fe $9.9 \cdot 10^{-4}$ -molar und in bezug auf H_2SO_4 0.005-n.

Wie in den Hämin-Katalase-Versuchen wurde auch hier vor dem Zufügen der H_2O_2 -Lösung $\frac{1}{2}$ Stde. geschüttelt. Die Menge des adsorbierten Eisens haben wir in diesem Versuch nicht bestimmt. Die beiden Kontrollversuche ohne Kohle und ohne Eisenchlorid (Fig. 8) wurden genau wie der Hauptversuch ausgeführt⁴⁴⁾ bei $T = 16^\circ$ und 712 mm.

II. Im nächsten Versuch (Fig. 9, 10 und 11) arbeiteten wir unter Bedingungen, in denen auch Eisenchlorid in Lösung gut meßbar H_2O_2 zersetzt, und beobachteten die Wirkung eines Zusatzes von Kohle, Tonerde oder Metazinnssäure. Im Hauptraum befanden sich 5 mg FeCl_3 , 6 H_2O + 10 mg H_2SO_4 in 25 ccm Wasser. Zugekippt wurden wie vorher 5 ccm 1.8-n. H_2O_2 . Reaktionsvolumen und H_2O_2 -Konzentration sind also wie oben, dagegen ist der Gehalt an Eisen $3.0 \cdot 10^{-2}$ Mol/Liter, an Schwefelsäure ist das Reak-

⁴²⁾ Das Ergebnis wurde in Versuchen bei Zimmer-Temperatur durch Titration mit KMnO_4 bestätigt.

⁴³⁾ Es wurde ein E. Mercksches analysenreines Präparat verwendet.

⁴⁴⁾ Setzt man zu dem Eisen-Kohle-Adsorbat unter sonst ganz gleichen Bedingungen 1 g Pyrogallol zu, so entwickeln sich zwar in der ersten Minute 1.5 ccm O_2 , die weitere Sauerstoff-Entwicklung bleibt aber vollständig aus. Gleichzeitig findet starke Purpurogallin-Bildung statt.

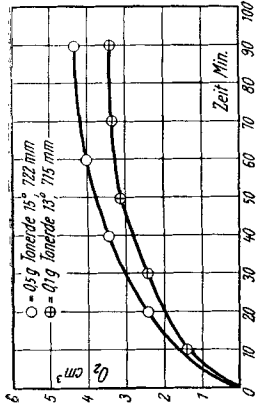


Fig. 1.

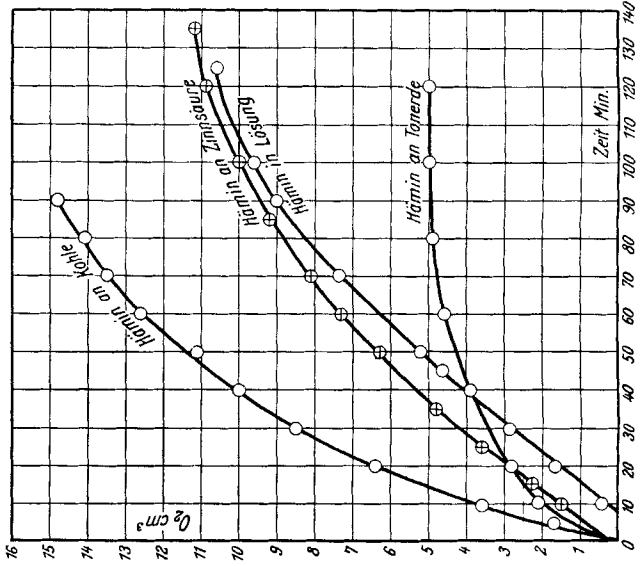


Fig. 2.

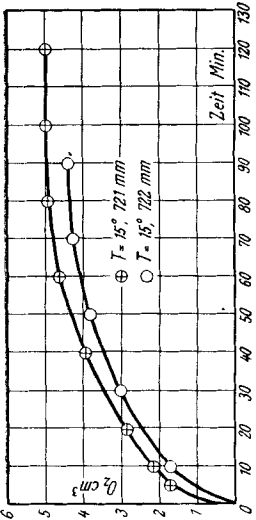


Fig. 3.

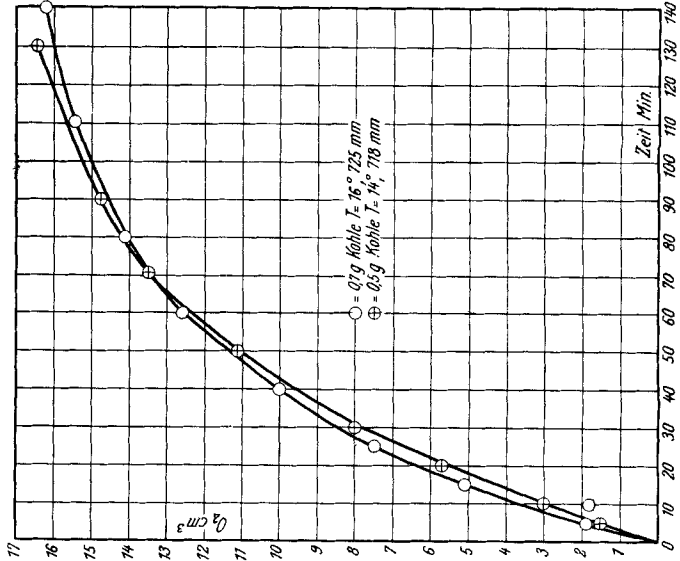


Fig. 4.

tionsvolumen 0.007-n. Setzt man 0,5 g Tonerde zu und schüttelt $\frac{1}{2}$ Stde. vor Zugabe der H_2O_2 -Lösung, so erhält man Kurve I der Fig. 9. Schüttelt man 2 Stdn. vor der Zugabe, so ergibt sich Kurve II. Hier ist also die katalytische Wirkung des Eisenchlorids allein (siehe Fig. 11) nahezu ganz erloschen. Im Filtrate des Tonerde-Adsorbates läßt sich Eisen mit Rhodan-ammonium nicht nachweisen. $T = 16^\circ, 722$ mm.

Verwendet man an Stelle der Tonerde 1 g Metazinnssäure (es wurde $\frac{1}{2}$ Stde. vor Zugabe des H_2O_2 geschüttelt), so erhält man die Kurve I der Fig. 10. Im Filtrat bestimmten wir das nicht adsorbierte Eisen colorimetrisch. Es ergab sich eine Adsorption von 85%. Kurve II stellt die katalytische Wirkung des Eisenchlorids ohne Adsorptions-Mittel dar. $T = 16^\circ, 722$ mm.

Fügt man als Adsorptionsmittel 0.2 g Tierkohle zu, so beobachtet man wie im ersten Versuch starke Aktivierung der H_2O_2 -Katalyse. Obwohl nur etwa 50% des Eisens adsorbiert sind (colorimetrisch bestimmt), war bereits in 8 Min. das ganze H_2O_2 zersetzt. Fügt man abermals 5 ccm 1.8-n. H_2O_2 zu, so ist wiederum in etwa 8 Min. vollständige Zersetzung eingetreten. Im Leerversuch ohne Eisenchlorid entwickelt die Kohle in 137 Min. 5.3 ccm Sauerstoff. In Fig. 11 vergleichen wir schließlich die katalytische Wirkung des Eisenchlorids mit und ohne die genannten Adsorptionsmittel.

III. Im Hauptraum des Gefäßes der Fig. I befinden sich 0.6 mg $FeCl_3 \cdot 6H_2O = 0.2$ mg Fe und 0.08 mg H_2SO_4 in 162.5 ccm Wasser. Zugekippt werden 10 ccm 0.33-n. H_2O_2 . Das Reaktionsvolumen beträgt also wie in den Hämin-Versuchen 172.5 ccm; die Lösung ist 10^{-5} -n. an H_2SO_4 ($p_H = 5$, durch Phosphat-Puffer bei den Hämin-Versuchen) und in bezug auf H_2O_2 und Fe ebenfalls den Hämin-Versuchen äquivalent. 10 ccm dieser Lösung (auch wenn an Stelle von H_2O_2 Wasser zugesetzt wird) geben mit 5 ccm 1-proz. Rhodan-ammonium-Lösung keine Färbung. Eine Sauerstoff-Entwicklung ist nicht zu beobachten. Fügt man 0.5 g Kohle zu, so erhalten wir Kurve I der Fig. 12. Die Kohle allein ohne Eisensalz entwickelt in 140 Min. 2.6 ccm Sauerstoff (Kurve II). Wir haben den Versuch 2-mal ausgeführt. Das erstmal wurde vor Zugabe des H_2O_2 $\frac{1}{2}$ Stde., das zweitemal 1 Stde. geschüttelt. Das erstmal war die Eisensalz-Lösung frisch bereitet und fast farblos, das zweitemal 50 Stdn. alt und schwach gelb gefärbt. Es ergab sich eine innerhalb des Meßgenauigkeit liegende Übereinstimmung.

Die Erhöhung der katalatischen Wirkung der Kohlen durch adsorbiertes Eisen ist eine empfindlichere Eisen-Reaktion als die Bildung des Ferri-rhodanids. Außerdem ist aus obigem Versuch ersichtlich, daß Eisen, an Kohle adsorbiert, plötzlich eine Katalase von derselben Größenordnung wie das Hämin wird.

Reduktion des Eisen(III)-chlorids durch Kohle.

Führt man den eben unter I angeführten Versuch so aus, daß an Stelle der 5 ccm H_2O_2 Wasser zugegeben wird, und zentrifugiert man nach 30 Min. ab, so geben 5 ccm der klaren Lösung mit 5 ccm 1-proz. Ferri-cyankalium-Lösung deutliche Blaufärbung. Die beiden Kontrollversuche ohne Kohle bzw. ohne Eisenchlorid geben nicht die Spur einer Färbung.

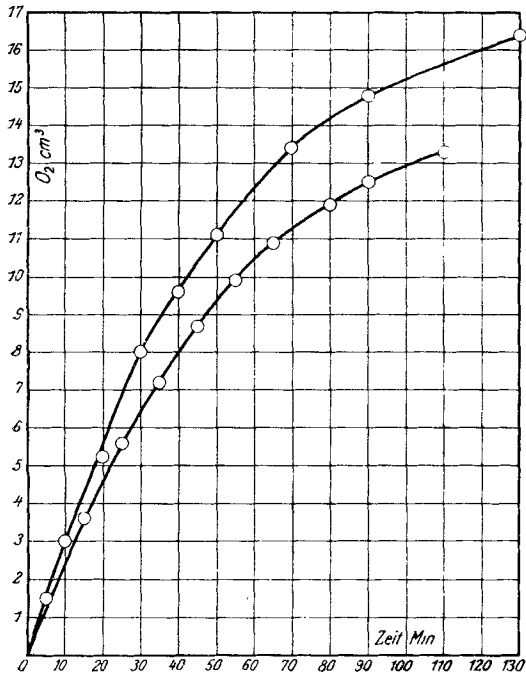


Fig. 6.

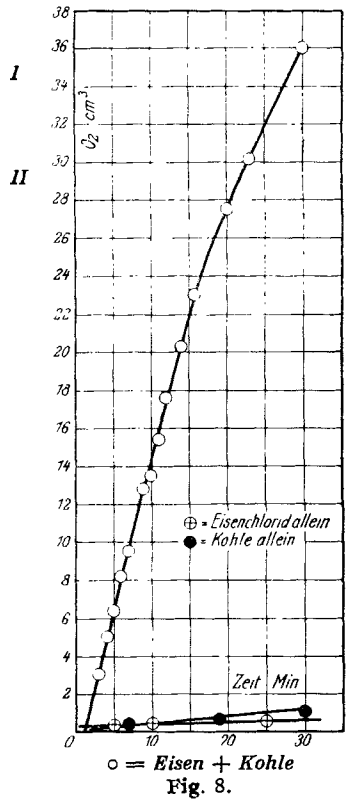


Fig. 8.

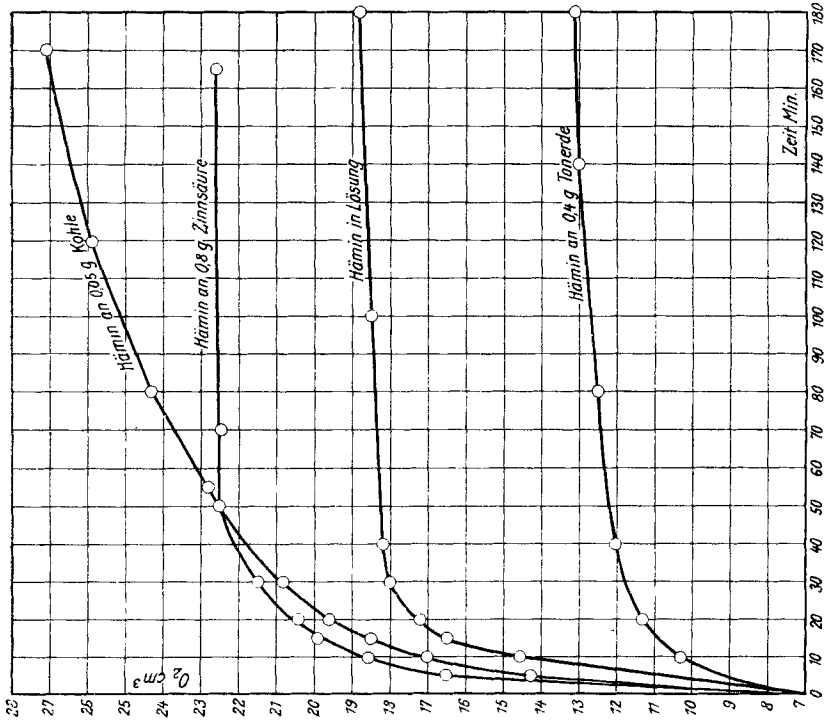


Fig. 7.

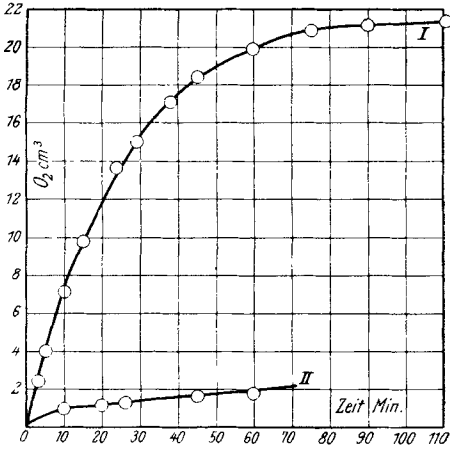


Fig. 9.

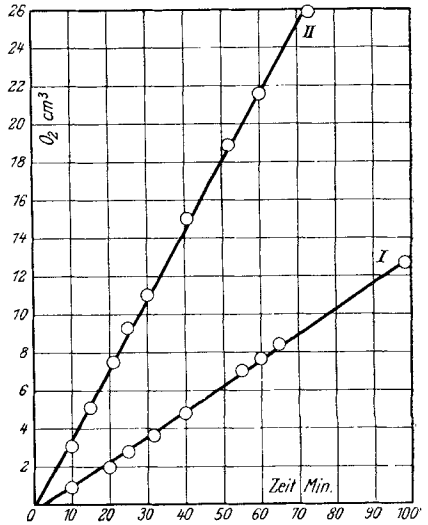


Fig. 10.

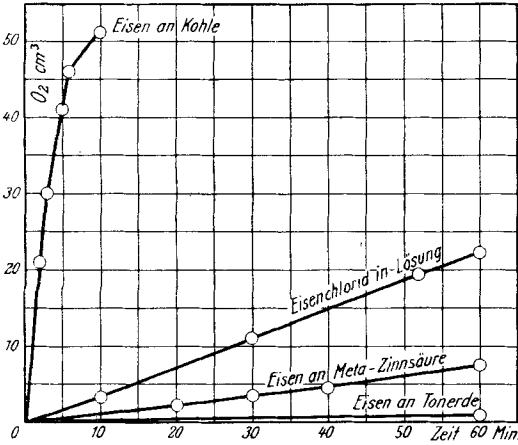


Fig. 11.

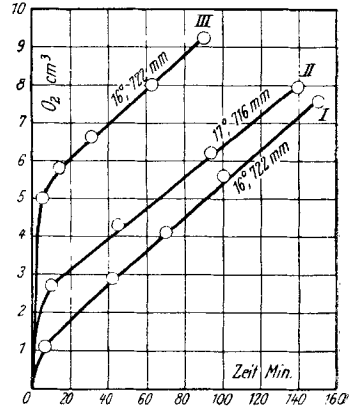


Fig. 13.

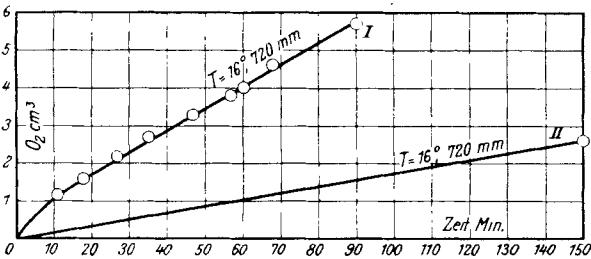


Fig. 12.

Übertragung von molekularem Sauerstoff⁴⁵⁾

I. Substrat: Leinöl.

Offizinelles Leinöl wurde in Form einer 2-proz. Suspension in $m/4$ -sek.-Phosphat verwendet. Da sich die Suspensionen bei längerem Stehen an der Luft verändern, waren die verwendeten Suspensionen höchstens 24 Stdn. alt.

Bei allen Versuchen wurden 25 ccm Hämin + 8 ccm der Suspension verwendet, so daß das Gesamtvolumen überall 33 ccm und die Lösung in Bezug auf Leinöl 0.5-proz. war. p_H betrug etwa 6.3.

Als Beispiel für die Reproduzierbarkeit unserer Versuche bringen wir zunächst in Fig. 13 die O_2 -Übertragung durch Hämin in Lösung. Die Versuche wurden an verschiedenen Tagen angestellt. Kurve III wurde mit den doppelten Mengen Leinöl, Hämin usw. ausgeführt; dementsprechend wurden hier die aufgenommenen O_2 -Mengen verdoppelt.

Auch die übrigen Sauerstoff-Übertragungen wurden mindestens 2-mal ausgeführt. Es wurde ausnahmslos gute Übereinstimmung erhalten.

Aus Fig. 14 ist ersichtlich, daß die Sauerstoff-Übertragung durch Hämin in Lösung und durch das Metazinn säure-Adsorbat keinen die Meßfehler überschreitenden Unterschied aufweist.

Als Kontrollversuche wurden gleichzeitig 25 ccm Hämin + 5 g Metazinn säure + 8 ccm $m/4$ -sek.-Phosphat und 25 ccm $m/50$ -sek.-Phosphat + 5 g Metazinn säure + 8 ccm Leinöl-Suspension geschüttelt. In beiden Versuchen haben wir keinen Sauerstoff-Verbrauch feststellen können.

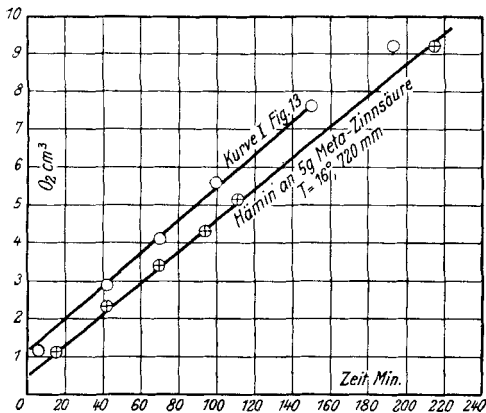


Fig. 14.

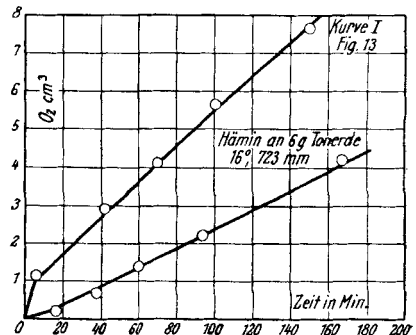


Fig. 15.

In Fig. 15 sehen wir, daß Hämin an Faser-Tonerde Sauerstoff wesentlich langsamer auf Leinöl überträgt als ohne Adsorbens. Als Kontrollversuche wurden wie oben Hämin + Tonerde ohne Substrat und Tonerde + Substrat ohne Hämin geschüttelt, und auch hier wurde kein Sauerstoff aufgenommen.

⁴⁵⁾ Der verwendete Sauerstoff stammte aus einer Bombe und war durch Lösungen von $KMnO_4$, Barythydrat, Schwefelsäure und Sublimat gereinigt.

Fig. 16 zeigt die Sauerstoff-Übertragung durch das Hämin-Kohle-Adsorbat. Wie an Tonerde, tritt auch hier wesentliche Schwächung gegenüber dem Versuch ohne Adsorbens ein. Die beiden Kontrollversuche wurden wie bei Zinnsäure und Tonerde ausgeführt, und ergaben auch hier keine über die Meßfehler gehende Sauerstoff-Aufnahme.

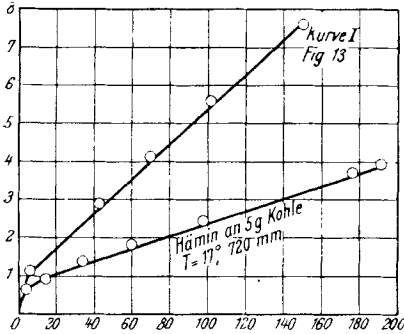


Fig. 16.

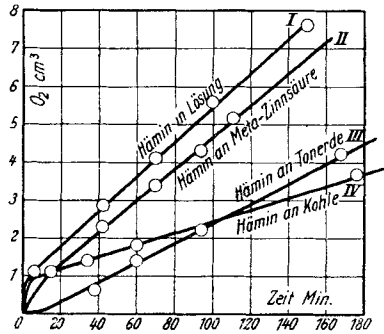


Fig. 17.

In Fig. 17 vergleichen wir die Übertragung von Sauerstoff auf Leinöl durch Hämin in Lösung und durch die Adsorbate an Tonerde, Metazinn- säure und Kohle.

Der folgende kinetische Vergleich⁴⁶⁾ wird ähnlich wie bei den Katalase- Versuchen durchgeführt, indem wir die Geraden, unter Vernachlässigung der ersten 5–8 Min., auf die Zeit = 0 extrapolieren:

1 mg Hämin (8.5% Fe) überträgt in 120 Min. auf 0.32 ccm einer 0.5-proz. Leinöl-Suspension in $m/4$ -sek.-Phosphat (p_H etwa = 6.3) bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 130 Touren pro Minute folgende Mengen Sauerstoff:

In Lösung: 210 ccm (16⁰, 722 mm).

An 0.24 g Tonerde: 120 ccm (16⁰, 723 mm).

An 0.2 g Metazinn- säure: 210 ccm (16⁰, 720 mm). An 0.2 g Kohle: 80 ccm (17⁰, 720 mm).

II. Substrat: Leucin.

Rac. Leucin wurde in Form einer 0.6-proz. wäßrigen Lösung verwendet. 25 ccm dieser Lösung wurden zu 15 ccm Hämin und 5 ccm $m/4$ -sek.-Phosphat gefügt. Das Reaktionsvolumen betrug 45 ccm und war in bezug auf Leucin 0.3-proz.

Wird diese Lösung bei 16⁰ geschüttelt, so können wir innerhalb 185 Min. keine Sauerstoff-Aufnahme feststellen. Fügen wir 3 g Metazinn- säure oder 4 g Tonerde zu, so erfolgt innerhalb 100 Min. ebenfalls keine O₂-Übertragung. Es wurden Kontrollversuche ausgeführt, in denen statt des Hämins 15 ccm $m/50$ -sek.-Phosphat verwendet wurden, auch hier wurde kein O₂-Verbrauch beobachtet.

Fügt man zu einer Lösung von 25 ccm Leucin + 15 ccm $m/50$ -sek.- Phosphat + 5 ccm $m/4$ -sek.-Phosphat 5 g Kohle, so beobachten wir in Übereinstimmung mit O. Warburg⁴⁷⁾ Sauerstoff-Aufnahme. Fügen wir

⁴⁶⁾ Die Substrat-Adsorption, die anders als bei den Katalase-Versuchen, hier sicher eine Rolle spielt, wurde nicht bestimmt.

⁴⁷⁾ z. B. O. Warburg und E. Negelein, Biochem. Ztschr. **113**, 257 [1921].

an Stelle des $m/_{50}$ -sek.-Phosphates 15 ccm Hämin zu, so finden wir mit unserer Methode keine Änderung in der O_2 -Übertragung.

III. Substrat: Fructose⁴⁸⁾.

10 ccm einer 10-proz. Lösung Kahlbaumscher „Lävulose“ wurden zu einer übersättigten Lösung von 10 ccm $m/_{2}$ -sek.-Phosphat zugefügt und dann mit 2.5 ccm $m/_{50}$ -sek.-Phosphat geschüttelt. Sauerstoff-Aufnahme: 0.9 ccm in 100 Min. Fügte man 0.5 g Metazinnsäure, 0.5 g Kohle oder 0.6 g Tonerde zu, so konnten wir keine Änderung gegen den Leerversuch feststellen. Gibt man an Stelle des $m/_{50}$ -sek.-Phosphates 2.5 ccm Hämin zu, so verläuft die Oxydation unverändert. Auch die Adsorption des Hämins an die oben genannten Adsorbentien ändert den Verlauf der Reaktion nicht⁴⁹⁾.

IV. Substrat: Dioxy-aceton⁵⁰⁾.

Die von F. Wind⁵¹⁾ entdeckte Oxydation des Dioxy-acetons in Phosphat-Lösung durch molekularen Sauerstoff wird nach unseren Beobachtungen durch Phosphat-Hämin weder in $m/_{5}$ - noch in $m/_{50}$ - Na_2HPO_4 meßbar beschleunigt.

1 g Dioxy-aceton (Oxantin-Höchst) wurde in 10 ccm Wasser gelöst und mit 12.5 ccm Phosphat-Hämin geschüttelt. Der O_2 -Verbrauch war derselbe wie im Kontrollversuch ohne Hämin. Dasselbe fanden wir in Versuchen mit der 10-fachen Phosphat-Menge Zusatz von 2.5 g Tierkohle änderte daran nichts.

Das Tonerde-Hämin-Adsorbat fanden wir in konz. Phosphat-Lösung ebenfalls wirkungslos. Das Adsorbat an Metazinnsäure erniedrigte dagegen die Reaktionsgeschwindigkeit bedeutend. Es handelt sich dabei um einen Einfluß der Metazinnsäure allein:

Zeit	1 g Dioxy-aceton + 10 ccm H_2O + 12.5 ccm $m/_{5}$ -sek.-Phosphat; 19.5°, 726 mm		1 g Dioxy-aceton + 10 ccm H_2O + 12.5 ccm $m/_{5}$ -sek.-Phosphat + 2.5 g Metazinnsäure; 19.5°, 726 mm	
	100 Min.	6.5	6.4 ccm O_2	0.3
200 Min.	13.8	13.0 ccm O_2	0.5	0.9 ccm O_2

⁴⁸⁾ vergl. O. Warburg und M. Yubusoe, Biochem. Ztschr. **146**, 380 [1924]; ferner O. Meyerhoff und K. Mutsuoka, Biochem. Ztschr. **150**, 1 [1924].

⁴⁹⁾ Selbst bei Anwendung der 10-fachen Hämin-Menge war keine Reaktionsbeschleunigung feststellbar. Dasselbe fanden wir bei Ersatz der Fructose durch Traubenzucker.

⁵⁰⁾ Zusatz bei der Korrektur am 28. Juni.

⁵¹⁾ Biochem. Ztschr. **159**, 58 [1925].