

## 286. Albert Reid: Über die Oxydation scheinbar autoxydabler Leukobasen durch molekularen Sauerstoff.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.]

(Eingegangen am 18. Juni 1930.)

Bei Versuchen über die oxydations-katalytische Wirkung des Methylenblaus in lebenden Zellen erhob sich die Frage, ob die Reoxydation der Leukobase eine wahre Autoxydation ist (wie es allgemein angenommen wird) oder ob auch hier nur scheinbar eine Autoxydation, in Wirklichkeit aber eine Sauerstoff-Übertragung durch Schwermetall vorliegt.

Die Oxydation der Leukobasen — als Versuchssubstanz dienten Leukomethylenblau sowie Leuko-thionin<sup>1)</sup> — wurde manometrisch in oft beschriebener Anordnung gemessen. Der Hauptraum des kegelförmigen Schüttelgefäßes<sup>2)</sup> (Quarzgefäß) enthielt 2 ccm wäßrigen Acetat-Puffer, der Gasraum Luft, die Ansatzbirne etwa 2 mg Leukobase. Die Temperatur des Thermostaten war 20°. Zur Zeit  $t = 0$  wurde die Leukobase in die Puffer-Lösung eingekippt. Dem Ziel der Arbeit entsprechend wurden alle Substanzen möglichst von metallischen Verunreinigungen befreit.

Darstellung und Reinigung der Leukobasen: Nach dem Prinzip der Methylenblau-Reduktion von Landauer und Weil<sup>3)</sup> wurde das „Thionin Ehrlich“ der Fa. Kahlbaum mit Phenyl-hydrazin reduziert. 2 g Thionin wurden in einem Reagensglas mit etwas Alkohol aufgeschlämmt und 0.8 g Phenyl-hydrazin dazugegeben. Mit einem Glasstabe wurde der Brei gut durchgerührt, wobei der bei der Reaktion frei werdende Stickstoff entwich, und die Masse sich etwas erwärmte. Nach  $\frac{1}{2}$  Stde. wurde der graue Brei mit wenig Alkohol auf ein Filter gebracht, abgesaugt und mit etwas Alkohol gewaschen. Die Substanz wurde dann auf dem Glasfilter im Vakuum-Exsiccator getrocknet. Zur Reinigung wurde das so gewonnene Leuko-thionin im Vakuum sublimiert. Alle Glasgefäße waren vor dem Gebrauch mit Chromsäure oberflächlich von metallischen Verunreinigungen befreit, und auch der verwendete Alkohol und das Phenyl-hydrazin waren zuvor in gereinigten Gefäßen destilliert.

Die Sublimation ging bei einem Druck von 0.05 mm bei einer Temperatur von 190–220° vor sich. Bei niedrigeren Temperaturen ging die Sublimation sehr langsam von statten, doch zersetzte sich schon bei 220° ein nicht unbedeutlicher Anteil der Substanz. Das sublimierte Produkt haftete in gelben Drusen an den Wandungen des Sublimations-Kölbchens. Die Ausbeute war 0.5 g = 25% des Ausgangsmaterials. Die Leukobase wurde im Vakuum aufbewahrt. An der Luft färbte sich die Substanz oberflächlich violett, bei 16 mm Druck jedoch blieb sie 1 Woche rein gelb und war erst nach 3 Wochen grünlich verfärbt. Entsprechend wurde Leuko-methylenblau dargestellt. Die Leukobase sublimiert bei 0.05 mm Druck und 180°. Die gut ausgebildeten gelben Krystalle schmolzen bei 185° und ergaben den theoretischen Stickstoffgehalt von 14.7%.

Darstellung und Reinigung der Puffer-Lösung: Die Befreiung von Metallspuren gelingt am leichtesten bei einem Körper, der sich destillieren

<sup>1)</sup> Leuko-thionin ist die dem Leuko-methylenblau entsprechende nicht methylierte Leukobase. <sup>2)</sup> Form wie Abbildung: Biochem. Ztschr. 177, 471 [1926].

<sup>3)</sup> B. 43, 198 [1910].

läßt. Deshalb wurde als Puffer ein Gemisch aus Essigsäure und Ammoniumacetat verwendet. Sowohl der Eisessig als auch das Ammoniak wurden in Quarzgefäßen destilliert und mit gleichfalls destilliertem Wasser auf die gewünschte — molare — Konzentration gebracht. Die Lösungen wurden in Porzellanflaschen aufbewahrt, da Glasgefäße nach einiger Zeit Metallspuren an die Lösung abgeben.

Die Geschwindigkeit der Oxydation hängt von der Wasserstoff-ionen-Konzentration ab und ist in einem Gemisch von 2 Tln. Essigsäure und 1 Tl. Ammoniumacetat ( $p_H$  ca. 4.5) am größten.

Einige Ergebnisse: Es zeigte sich, daß Spuren von Kupfersalzen — Mengen, wie sie als Verunreinigungen in den Laboratoriums-Reagenzien vorkommen — die Oxydation des Leuko-thionins beschleunigen:

Tabelle 1.

Temp. 20°, Gasraum Luft, je 2.0 mg Leuko-thionin, Kupfer als Kupfersulfat zugesetzt  
Vol. der Lsg. 2 ccm.

Zugesetzte mg Cu	I	II	III	IV
	0	0.0001	0.0005	0.001
Zeit (in Minut.)	cmm Sauerstoff nach Minuten			
2'	3	6	12	23
4'	5.5	11	21	37
∞	—	—	98	102

Zu der Tabelle ist zu bemerken, daß nur die Zahlen in I und II zur Berechnung der Oxydationsgeschwindigkeit dienen können. In III und IV ist die Oxydationsgeschwindigkeit so groß, daß der aufgenommene Sauerstoff von der Schüttelgeschwindigkeit abhängig ist.

Aus der Tabelle ersieht man, daß  $\frac{1}{10000}$  mg Kupfer, zu 2 ccm Puffer-Lösung zugefügt, die Oxydation des Leuko-thionins beschleunigt, daß aber auch ohne Zusatz von Kupfer eine Oxydation vor sich geht. Doch auch diese Oxydation ist im wesentlichen eine Metall-Katalyse, denn sie sinkt bei Anwesenheit von Kohlenoxyd auf einen sehr kleinen Betrag herab, wie folgende Tabelle zeigt:

Tabelle 2.

Temp. 20°, kein Kupfer zugesetzt. Vol. der Lsg. 2 ccm.

mg Leuko-thionin Gasraum	1.8 Luft	2.2 80% CO, 20% O <sub>2</sub>	2.2 75% N <sub>2</sub> , 25% O <sub>2</sub>	2.0 75% CO, 25% O <sub>2</sub>
Zeit (in Minut.)	cmm Sauerstoff			
5'	8.5	0	15.5	0
160'	—	11	—	21.5

Die Anfangs-Oxydationsgeschwindigkeit bei Gegenwart von Kohlenoxyd läßt sich angenähert aus dem Sauerstoff-Verbrauch in 160 Min. berechnen, wenn man annimmt, daß infolge der kleinen Reaktionsgeschwindigkeit die Umsatz-Zeitkurve linear verläuft. Man errechnet so für das Gasgemisch von 80% CO und 20% O<sub>2</sub> einen Sauerstoff-Verbrauch von 0.035 cmm in 5 Min.

Mit anderen Worten: die Oxydationsgeschwindigkeit sinkt durch die Anwesenheit von Kohlenoxyd auf etwa 5% des Betrages in einem kohlenoxydfreien Gasgemisch gleicher Sauerstoff-Konzentration.

In dem Versuch der Tabelle 2 hemmt Kohlenoxyd die Oxydation des Leuko-thionins, dem kein Kupfer zugesetzt ist. Der folgende Versuch (Tabelle 3) zeigt, daß Kohlenoxyd auch die Wirkung des zugesetzten Kupfers hemmt.

Tabelle 3.

Temp. 20°, je 2.0 mg Leuko-thionin und 0.001 mg Kupfer zugesetzt.

Gasraum	Luft	80% CO, 20% O <sub>2</sub>
ccm Sauerstoff nach 3 Minut.	35	1

Zu der Tabelle ist zu bemerken: 1) daß der Sauerstoff-Verbrauch in Luft im wesentlichen auf der Wirkung des zugesetzten Kupfers beruht (ohne Kupfer-Zusatz beträgt der Sauerstoff-Verbrauch nach Tabelle 1 in 3 Min. 4 cmm), 2) daß der Sauerstoff-Verbrauch in kohlenoxyd-haltigem Gas aus den Werten für längere Beobachtungsdauer (nach 30 Min.: 9 cmm) errechnet ist.

Ganz entsprechend verliefen die Versuche mit Leuko-methylenblau, d. h. Kupfermengen, wie sie in den Laboratoriums-Reagenzien als Verunreinigungen vorkommen, beschleunigen die Oxydation außerordentlich. Kohlenoxyd hemmt sowohl die Oxydation des scheinbar reinen Präparats als auch die Wirkung des zugesetzten Kupfers.

Die Versuche wurden auf Veranlassung von Hrn. Warburg ausgeführt. Sie zeigen, daß unter den Bedingungen meiner Versuche weder Leuko-methylenblau noch Leuko-thionin autoxydabel sind. Spuren von Kupfer, wie sie als Verunreinigungen vorkommen und nicht entfernt werden können ( $\sim \frac{1}{100000}$  mg/ccm) sind durch ihre katalytische Wirkung imstande, die noch gefundene Rest-Oxydation hervorzurufen.

## 287. K. Hess, K. Dziengel und H. Maass: Zur Kenntnis der Einwirkung von Hypojodit-Lösung auf Cellulose-Präparate.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Chemie.]

(Eingegangen am 21. Juni 1930.)

M. Bergmann und H. Machemer<sup>1)</sup> geben ein Verfahren zur Bestimmung der mittleren Molekülgröße von Cellulose-Präparaten an, das darauf beruht, daß diese der oxydierenden Wirkung einer  $n/_{10}$ -Hypoiodit-Lösung ausgesetzt werden. Es wird angenommen, daß der Jodverbrauch (ccm  $n/_{10}$ -Jodlösung/1 g Sbst. = Jodzahl) der Oxydation der Aldehydgruppe zur Carboxylgruppe am endständigen Glucose-Glied einer Hauptvalenzkette entspricht, so daß die Jodzahl ohne weiteres zur Bestimmung der Molekülgröße benutzt werden kann.

Wir weisen darauf hin, daß für diese Art der Molekülgrößen-Bestimmung eine wichtige Voraussetzung die Einheitlichkeit der Präparate ist. Für die in Frage stehenden Cellulose-Präparate ist diese Voraussetzung

<sup>1)</sup> B. 63, 316 [1930].