

## 21. Thomas Fotheringham Macrae: Über die Autoxydation von Leuko-methylenblau<sup>1)</sup>.

[Aus d. Chem. Laborat. d. Bayr. Akad. d. Wissenschaften zu München.]  
(Eingegangen am 1. Dezember 1930.)

Bei enzymatischen Dehydrierungen läßt sich der molekulare Sauerstoff vielfach durch Methylenblau als Wasserstoff-Acceptor vertreten. Kombiniert man die beiden Stoffe, d. h. läßt man eine Dehydrierung, wie z. B. die von Alkohol durch Essigsäure-Bakterien oder die von Bernsteinsäure zu Fumarsäure, in der Gegenwart beider vor sich gehen, so hat der Sauerstoff wahrscheinlich nur die sekundäre Funktion, die Leukoverbindung wieder zum Farbstoff zu reoxydieren. Die Geschwindigkeit dieses Vorgangs begrenzt die des Gesamtverlaufs, und zur Kontrolle dieser Verhältnisse ist von Wieland und Bertho<sup>2)</sup> die Geschwindigkeit der Autoxydation von Leuko-methylenblau unter den für die Essigsäure-Gärung maßgebenden Bedingungen bestimmt worden. Für das schwach alkalische Medium, in dem die Succino-Dehydrase und die beiden Dehydrasen der Milch ihre größte Wirksamkeit haben, war diese Bestimmung noch nachzuziehen.

Bei der Prüfung des Einflusses von Hydroperoxyd auf die Xanthin-Dehydrase und Aldehydrase der Milch ließ sich feststellen, daß Leuko-methylenblau durch  $H_2O_2$  nur langsam zum Farbstoff dehydriert wird: Die Entfärbungszeiten werden durch vorhandenes Hydroperoxyd nur in geringem Maße erhöht<sup>3)</sup>. Wenn aber auf Grund dieser Beobachtung Leuko-methylenblau mit Hydroperoxyd langsamer reagiert als mit Sauerstoff, so mußte das Auftreten von Hydroperoxyd, das ebenso wie bei der Autoxydation von Hydrochinon, Indigweiß und ähnlichen Verbindungen als erste Stufe der Dehydrierung zu erwarten ist, bei den angeführten enzymatischen Prozessen mit Methylenblau +  $O_2$  als Wasserstoff-Acceptoren berücksichtigt werden.

Darstellung des Leuko-methylenblaus. Man hydrierte kleine Mengen Methylenblau-Lösung mit Milch-Enzym<sup>4)</sup> und der etwa berechneten Menge Hypoxanthin unter  $O_2$ -Ausschluß in Thunberg-Röhren unter reinstem Stickstoff. Um jede Spur von Hydroperoxyd auszuschließen, wurde gleichzeitig wenig Katalase der Reaktionslösung zugefügt. Nach beendeter Entfärbung wurden die Fermente durch 10 Min. langes Erhitzen auf dem Dampfbad zerstört. Bei geringer Methylenblau-Konzentration blieb die Leukoverbindung gelöst, bei etwas größerer befand sie sich in feinkristalliner Suspension.

Messung der Sauerstoff-Aufnahme in der Barcroft-Apparatur bei  $pH = 8.0$ .

1. Im Thunberg-Rohr wurde die Mischung von 8 ccm  $3n/1000$ -Methylenblau-Lösung, 1 ccm Katalase-Lösung (aus 4 mg Leber-Katalase), 0.8 ccm  $m/100$ -Hypoxanthin, 1 ccm  $m/30$ - $Na_2B_4O_7$ , 0.5 ccm  $n/6$ -Essigsäure und 1.7 ccm Wasser in der üblichen Weise luft-frei gemacht. Dann fügte man 2 ccm Enzym-Lösung (aus 20 mg Präparat) hinzu.  $pH = 8.0$ . Nach der Entfärbung wurden die Enzyme durch Erhitzen zerstört. Die er-

<sup>1)</sup> Die Arbeit wurde auf Anregung von Prof. H. Wieland ausgeführt. Dem Carnegie-Trust in Edinburg, der mir ein Stipendium verliehen hat, danke ich auch hier bestens für seine Unterstützung.

<sup>2)</sup> A. 467, 131 [1928].

<sup>3)</sup> Wieland u. Macrae, A. 483, 239 [1930].

<sup>4)</sup> Dargestellt nach Wieland u. Rosenfeld, A. 477, 36 [1929].

kaltete Lösung wurde sehr rasch in ein Barcroft-Gefäß gebracht und bei 25° unter Luft geschüttelt. Die Ablesung begann nach dem innerhalb 4 Min. erreichten Temperatur-Ausgleich.

2. Ansatz mit Cer(III)-hydroxyd: Wie 1. Statt 1 ccm 1.5 ccm  $m/_{50}$ - $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ , keine Essigsäure, kein weiteres Wasser. Dagegen nach der Entfärbung 1.5 ccm  $m/_{50}$ - $\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_3$ . pH auch hier = 8.0.

3. Ansatz mit Katalase: Wie 1. Statt der 1.7 ccm Wasser wurden nach Zerstörung der Enzyme in die gekühlte Lösung 1.7 ccm Katalase-Lösung gebracht.

Dieselbe Versuchsreihe wurde wiederholt (Tabelle 2). Die aufgenommenen cmm Sauerstoff sind in Tabelle 1 und 2 wiedergegeben.

Tabelle 1.				Tabelle 2			
Zeit (Min.)	1	2	3	Zeit (Min.)	1	2	3
3	16	36	13	3	11	22	9
6	34	58	27	6	25	40	16
9	49	76	38	12	54	72	40
15	76	107	56	24	110	128	81
21	103	134	76	36	152	163	95
27	132	156	94	48	194	182	105
39	185	196	125	72	242	210	119
51	224	216	145	96	251	218	123
99	264	244	161	120	251	220	123
147	264	244	159				

Wenn aller Sauerstoff als Hydroperoxyd auftreten soll, errechnet sich eine  $\text{O}_2$ -Aufnahme von 269 cmm. Sie wird in beiden Reihen in 1 nahezu erreicht, ein Hinweis darauf, daß das gebildete  $\text{H}_2\text{O}_2$  sich nur in sehr geringem Umfang an der Dehydrierung des Leuko-methylenblau beteiligt. Diese Tatsache wird weiterhin durch den Vergleich der Färbungszeiten mit  $\text{O}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  bestätigt werden. Cer(III)-hydroxyd beschleunigt die  $\text{O}_2$ -Aufnahme. Dies ist auch die Ursache für den scheinbar geringeren Sauerstoff-Verbrauch in 2 gegenüber 1. In den vor der Ablesung liegenden 4 Min. ist nämlich in den Versuchen mit Cer bereits mehr Sauerstoff aufgenommen worden, als in 1.

In den Ansätzen 3 wird die Aufnahme von 135 cmm  $\text{O}_2$  erwartet. Damit stimmt der Wert in Tabelle 2 gut, der in Tabelle 1 weniger befriedigend überein.

#### Bestimmung des gebildeten Hydroperoxyds.

1. Wie in Ansatz 1 wurde eine Suspension von Leuko-methylenblau, aber aus 10 ccm  $3n/_{1000}$ -Methylenblau-Lösung (statt 8 ccm) dargestellt. Nach Zerstörung der Enzyme wurde bei 18° ein lebhafter Luftstrom 90 Min. durch die Lösung hindurchgeleitet. Die blaue Lösung wurde im Vakuum zur Trockne destilliert, im Destillat das Hydroperoxyd mit Titan-schwefelsäure colorimetrisch bestimmt.

Gef.  $0.40 \times 10^{-5}$  Mol. Ber.  $1.5 \times 10^{-5}$  Mol.

Es werden nach dieser verlustreichen Methode 26.6% der theoretisch möglichen Menge an Hydroperoxyd gefunden.

2. Es wurde genau wie bei 1 verfahren. Die reoxydierte Lösung wurde 15 Min. lang mit der Cerhydroxyd-Suspension aus 1.5 ccm  $m/_{50}$ - $\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_3$  + 1.5 ccm  $m/_{50}$ - $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  geschüttelt, der Niederschlag abzentrifugiert und zur Entfernung von anhaftendem Farbstoff 4-mal mit Wasser gewaschen. Der Rückstand hatte die gelbe Farbe des Cerperoxyds. Die Bestimmung des aufgenommenen Hydroperoxyds erfolgte nach

ler kürzlich beschriebenen Katalase-Methode<sup>5</sup>). Es wurden in 2 Ansätzen (I und II) verbraucht:

	I	II
ccm $n/100$ - $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	0.68	0.60
% d. Th. an $\text{H}_2\text{O}_2$	68	60

3. Die Durchführung der Versuche war die gleiche wie in 2. Nur wurde das Cer (III)-hydroxyd vor dem Durchleiten von Luft durch die Leuko-methylenblau-Suspension zugesetzt. Während in 2 das am Ende der Reoxydation vorhandene  $\text{H}_2\text{O}_2$  bestimmt wurde, sollte es hier alsbald nach seiner Entstehung abgefangen werden.

	I	II
ccm $n/100$ - $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	0.95	0.88
% d. Th. an $\text{H}_2\text{O}_2$	95	88

Es ergibt sich, daß mit dem Cer-Reagens das bei der aeroben Dehydrierung von Leuko-methylenblau auftretende Hydroperoxyd fast quantitativ festgehalten werden kann. Auch ohne dieses Abfangmittel sind am Ende des Versuches bei  $p_{\text{H}} = 8.0$  noch  $\frac{2}{3}$  des gebildeten Hydroperoxyds nachzuweisen. Der Rest wird wohl von der aus dem Hypoxanthin entstandenen Harnsäure verbraucht.

#### Dehydrierungs-Geschwindigkeit von Leuko-methylenblau durch Sauerstoff und durch Hydroperoxyd.

Das Ergebnis der im vorhergehenden Abschnitt mitgeteilten Versuche zeigt, daß Leuko-methylenblau von molekularem Sauerstoff bedeutend rascher in den Farbstoff zurückverwandelt wird, als durch Hydroperoxyd. Das Verhältnis der Reaktions-Geschwindigkeiten soll nun auch zahlenmäßig erfaßt werden. Man verfuhr in der Weise, daß man 2 auf gleichem Wege dargestellte Leuko-methylenblau-Lösungen (nicht Suspensionen) einmal mit  $\text{O}_2$ -gesättigtem Wasser und gleichzeitig mit der äquivalenten Menge  $\text{H}_2\text{O}_2$  in gleicher Konzentration zur Oxydation brachte und die Zeiten bestimmte, innerhalb deren von beiden die Farbstärke einer als Maßstab dienenden Methylenblau-Lösung erreicht war. Die Genauigkeit dieser einfachen Methode ist nicht sehr groß; sie beträgt etwa  $\pm 15\%$ . Für den vorliegenden Zweck genügt sie.

A. Bei  $p_{\text{H}} = 8.0$ : 1. In der beschriebenen Weise wurde eine Methylenblau-Lösung entfärbt; sie enthielt 1 ccm  $n/1000$ -Methylenblau im Gesamtvolumen von 3.1 ccm, nachdem mit  $m/10$ -Phosphat-Puffer auf  $p_{\text{H}} = 8.0$  eingestellt war. Zu dieser Lösung, die vorher in einem kleinen Röhrchen evakuiert wurde, fügte man 1.9 ccm einer bei  $20^\circ$  gesättigten Sauerstoff-Lösung, die in das Vakuum ohne Bildung einer Gasphase eingelassen wurde, derart daß in den 5 ccm die  $\text{O}_2$ -Konzentration  $5 \times 10^{-4}$ -molar wurde. Man bestimmte nun die Zeit, die nötig war, um die Farbe dieser Lösung bei  $37^\circ$  zu der einer  $n/10000$ -Methylenblau-Lösung (auch 5 ccm) gelangen zu lassen.

2. Die Leuko-methylenblau-Lösung hatte den gleichen Gehalt wie in 1. Ihr Volumen von 4.75 ccm wurde mit 0.25 ccm  $m/100$ - $\text{H}_2\text{O}_2$  auf 5 ccm gebracht. Dann bestimmte man wie in 1 die Zunahme der Färbung.

3. Es ist schon früher erkannt worden<sup>6</sup>), daß die Autoxydation bei  $p_{\text{H}} = 5.6$  von Blausäure nicht gehemmt wird. Unter den gleichen Bedingungen wie bei 1. und 2. wurde auch bei hier  $p_{\text{H}} = 8.0$  auf einen etwaigen Einfluß an Blausäure, und zwar in  $m/200$ -Konzentration geprüft.

<sup>5</sup>) A. 488, 229 [1930].

<sup>6</sup>) A. 467, 131 [1928].

Mit der Sauerstoff-Lösung wie in 1 wurde 0.25 ccm  $m_{/10}$ -HCN zum Leuko-methylenblau gefügt, wobei das Vol. von 0.25 ccm an Phosphat-Puffer eingespart wurde.

Jeder der Versuche wurde 4-mal ausgeführt, je 2 der gleichen Reihe gleichzeitig und zwischen 1, 2 und 3 variierend.

	1				2				3			
Zeit (Min.) . . . . .	1.2	1.4	1.5	1.3	15.	13.5	14.	16.	1.3	1.5	1.5	1.2
im Mittel . . . . .	1.4				14.6				1.4			

Die Geschwindigkeit, mit der Leuko-methylenblau oxydiert wird, ist bei  $p_H = 8.0$  für molekularen Sauerstoff etwa 10-mal größer als für Hydroperoxyd. Die Autoxydation wird durch Blausäure nicht im mindesten gehemmt.

B. Bei  $p_H = 5.6$ : Die Ansätze waren die gleichen wie unter A. Nur wurde  $m_{/10}$ -Phosphat-Puffer  $p_H = 5.6$  verwendet. Je 4 Versuche.

	1				2			
Zeit (Min.) . . . . .	2.6	3.0	3.2	3.1	8.5	7.0	7.5	8.0
im Mittel . . . . .	3.0				7.8			

Bei  $p_H = 5.6$  ist die Geschwindigkeit der Autoxydation von Leuko-methylenblau ungefähr 100% kleiner als bei  $p_H = 8.0$ , die der Dehydrierung durch Hydroperoxyd erhöht sich um etwa ebensoviel. Die Geschwindigkeit der Autoxydation ist nur noch um das  $2^{1/2}$ -fache größer. Die gefundene Abhängigkeit der Autoxydations-Geschwindigkeit des Leuko-methylenblaus vom  $p_H$  stimmt gut mit den Ergebnissen von Clark, Cohen und Gibbs<sup>7)</sup> überein; sie stimmt nicht überein mit der Angabe von A. Reid<sup>8)</sup>, nach der das optimale Medium bei  $p_H = 4.5$  liegen soll.

Über den Einfluß von Kohlenoxyd: Ebensovienig wie durch Blausäure, ließ sich durch Kohlenoxyd eine Hemmung der Autoxydation von Leuko-methylenblau feststellen<sup>9)</sup>.

Es wurden, wie beschrieben, Suspensionen von Leuko-methylenblau aus 8 ccm  $3n_{/1000}$ -Methylenblau im Gesamtvolumen von 11 ccm dargestellt. Erst nach der Entfärbung und Zerstörung der Enzyme wurden 3 ccm  $m_{/1}$ -Acetat-Puffer (Ammoniumacetat, Essigsäure 1:2)  $p_H = 4.5$  zugefügt. Die Gemische wurden rasch in Barcroft-Gefäße gebracht und mit Luft (2 Versuche, Ia und Ib), sowie mit einer Mischung von 80% Kohlenoxyd und 20% Sauerstoff (IIa und IIb) bei 25° geschüttelt. Die Zahlen in Tabelle 3 bedeuten cmm  $O_2$ .

Tabelle 3.

Zeit (Min.)	I		II	
	a	b	a	b
20	18	18	20	22
40	36	34	34	38
60	58	58	61	65
80	87	89	99	101
100	110	117	134	132
120	134	141	159	161
140	161	168	186	188
160	185	191	204	202
200	214	213	215	211
240	219	217	217	213
300	219	217	217	213

Es läßt sich aus den Werten der  $O_2$ -Aufnahme nicht die geringste Hemmung durch CO herauslesen, eher noch eine kleine Reaktions-Beschleunigung, die ich aber nicht für typisch halte.

Die Versuche lassen sich direkt mit denen von S. 134 vergleichen (Tab. 1). Man sieht, daß die Steigerung der Acidität auf  $p_H = 4.5$  die Autoxydation erheblich über den für  $p_H = 5.6$  colorimetrisch gefundenen Betrag von 100% hinaus gegenüber der bei  $p_H = 8.0$  verlangsamt. Das hat zur Folge, daß das primär entstehende Hydroperoxyd

<sup>7)</sup> Publ. Health Rep. of U. S. Publ. Health Serv. 1925, 1131. <sup>8)</sup> B. 63, 1921 [1930].

<sup>9)</sup> Reid (a. a. O.) findet eine sehr starke Hemmung gegenüber der katalytischen Wirkung vor Cu.

z. T. verbraucht wird, d. h. die  $O_2$ -Aufnahme erreicht nicht den zuvor gefuhenen vollen Betrag von 269 cmm  $O_2$ , sondern nur etwa 80% dieses Volumens.

Einfluß von Eisen auf die Autoxydation bei  $p_H = 8.0$ .

Ansätze: 1. Wie 1 (S. 135), aber  $T = 0^\circ$  (Borat-Puffer), 2. Wie 1, aber 0.1 ccm  $m/_{800}$ - $FeCl_2$  am Anfang zugefügt, 3. Wie 2, aber 0.25 ccm  $m/_{10}$ -HCN mit Sauerstoff-Lösung zugegeben.

Konzentration von Leuko-methylenblau: Überall  $1 \times 10^{-4}$ -mol.

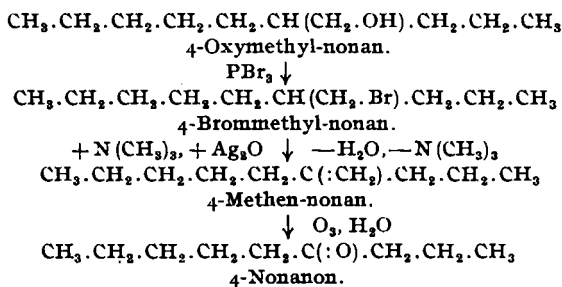
	1. ( $5 \times 10^{-4}$ -mol. $O_2$ )	2. ( $5 \times 10^{-4}$ -mol. $O_2$ + $4 \times 10^{-5}$ Fe'')	3. ( $5 \times 10^{-4}$ -mol. $O_2$ , $4 \times 10^{-5}$ -mol. Fe'', $5 \times 10^{-3}$ -mol. HCN)			
Zeit .....	14.0	17.0	2.6	2.8	6.5	7.0
(Min.) .....	13.0	16.0	2.9		4.5	5.0
Mittelwert .....	15.0		2.8		5.8	

Zusatz von Eisen in der angegebenen Konzentration bewirkt eine Beschleunigung um das 5-fache. Diese Beschleunigung wird durch die 125-fach molare Konzentration von Blausäure auf die Hälfte vermindert. Die Abhängigkeit der Färbungszeit von der Temperatur ist die normale: Bei  $37^\circ$  im Mittel 1.4, bei  $0^\circ$  15.0 Min.

## 22. K. Winterfeld und F. W. Holschneider: Über die Konstitution des Lupinins (I. Mitteil.).

[Aus d. Pharmazent. Abteil. d. Chem. Laborat. d. Universität Freiburg i. B.]  
(Eingegangen am 21. November 1930.)

Für das Lupinin,  $C_{10}H_{19}ON$ , einem Alkaloid der gelben Lupine, *Lupinus luteus*, sind in den letzten Jahren drei Konstitutions-Formeln aufgestellt worden. Formel I von Cl. Schöpf<sup>1)</sup>, Formel II und III von P. Karrer<sup>2)</sup> und ihren Mitarbeitern. Cl. Schöpf suchte seine Formel durch Vergleich mit ähnlich zusammengesetzten Abbauprodukten der China-Alkaloide zu stützen. Jedoch ergaben sich keine Analogien. Dagegen gelang es P. Karrer, gewichtige Beweise für die von ihm aufgestellten Konstitutionsformeln zu erbringen. Er unterwarf das Lupinin dem Hofmannschen Abbau, der so durchgeführt wurde, daß die jeweils entstandenen ungesättigten Zwischenprodukte sofort hydriert wurden. Nach Eliminierung des Stickstoffs verblieb ein einfach ungesättigter Alkohol  $C_{10}H_{20}O$ , der über den gesättigten Alkohol  $C_{10}H_{22}O$  in den ungesättigten Kohlenwasserstoff  $C_{10}H_{20}$  übergeführt wurde. Bei der Ozon-Spaltung dieses Kohlenwasserstoffs fand Karrer das 4-Nonanon:



<sup>1)</sup> A. 465, 97 [1928].

<sup>2)</sup> Helv. chim. Acta 11, 1062 [1928].