

Nachdem von dem ausgeschiedenen NaBr abfiltriert worden war, wurde die Hauptmenge des Alkohols abdestilliert. Der Rückstand wurde mit einer 5-proz. alkohol. Lösung von NaOH gekocht. Nach beendeter Hydrolyse (3—4 Stdn.) wurde der Alkohol abdestilliert, der Rückstand mit Wasser verdünnt und einmal mit Äther extrahiert, um unveränderten Ester zu entfernen. Die wäßrige Lösung wurde nach dem Ansäuern mehrmals mit Äther ausgezogen, die ätherische Lösung über Magnesiumsulfat getrocknet und der Äther abdestilliert. Der Rückstand siedete fast vollständig zwischen 244—245° unter 685 mm Druck.

$C_8H_{16}O_2S$ . Ber. S 23,8, Mol.-Gew. 134. Gef. S 23,1, Mol.-Gew. 132,4.

Brucinsalz der Propylmercapto-essigsäure: Äquimol. Mengen der obigen Säure und Brucin in Alkohol wurden vermischt und in einem Exsiccator über konz. Schwefelsäure sich selbst überlassen. Am nächsten Tage begannen lange, nadelförmige Krystalle sich abzuscheiden. Nach 2 Tagen wurden sie gesammelt und durch 1-maliges Umlösen aus Alkohol gereinigt. Sie schmolzen nach dem Trocknen im Vakuum über Schwefelsäure bei 114°.

$C_{20}H_{36}O_4N_2S$ . Ber. N 5,3, S 6,0. Gef. N 5,02, S 5,5.

Einwirkung von Äthyljodid auf das Brucinsalz der Propylmercapto-essigsäure: Ein Gemisch des Brucinsalzes der Propylmercapto-essigsäure (5 g) und Äthyljodid (10 g) erstarrte nach mehrstdg. Aufbewahren zu Klumpen. Die feste Masse wurde durch Filtrieren abgetrennt, nacheinander mit kaltem Alkohol und Äther ausgewaschen und dann im Vakuum getrocknet.

$C_{22}H_{41}O_4N_2J$ . Ber. J 23,1. Gef. J 22,3.

Die Verbindung erwies sich als identisch mit einer Probe eines direkt aus Brucin und Äthyljodid hergestellten Brucin-Jodäthylats. Aus dem alkohol. Filtrat wurde Propylmercapto-essigsäure isoliert.

## 81. A. Schöberl: Cystein und Glutathion als Antikatalysatoren bei Oxydationen mit molekularem Sauerstoff.

[Aus d. Chem. Institut d. Universität Würzburg.]

(Eingegangen am 13. Januar 1931.)

Seit der Entdeckung des Glutathions durch Hopkins<sup>1)</sup> im Jahre 1921 wird die Frage nach der Teilnahme von Sulfhydryl-(SH-)verbindungen bei Oxydations-Reaktionen im Organismus eifrig diskutiert. Auf Grund zahlreicher Untersuchungen steht fest, daß Glutathion im Organismus weit verbreitet ist<sup>2)</sup>. Die notwendigen experimentellen Ergebnisse stammen in der Hauptsache aus den grundlegenden Arbeiten von O. Meyerhof<sup>3)</sup> und F. G. Hopkins<sup>4)</sup> und seiner Schule. Danach glaubte man, das Glutathion als Katalysator ansprechen zu dürfen, der den sonst so trägen molekularen Sauerstoff zu einem Teil seiner erstaunlichen Leistungen im Muskel befähigt, und es fehlt nicht an Stimmen in der Literatur, welche

<sup>1)</sup> F. G. Hopkins, Biochem. Journ. 15, 286 [1921].

<sup>2)</sup> siehe A. Blanchetière, Journ. Physiol. Pathol. gén. 27, 1, 19 [1929].

<sup>3)</sup> O. Meyerhof, Arch. Physiol. 170, 433 [1918], 199, 531 [1923].

<sup>4)</sup> F. G. Hopkins, Biochem. Journ. 19, 787 [1925].

die SH-Gruppe in den Mittelpunkt der Zellatmung stellen wollen. Inzwischen sind unsere Kenntnisse über die Isolierung und Eigenschaften von Glutathion durch die erneuten Untersuchungen von Hopkins<sup>5)</sup> einerseits und Kendall, McKenzie und Mason<sup>6)</sup> andererseits wesentlich bereichert worden. Meldrum und Dixon<sup>7)</sup> fanden vor kurzem, daß reines kristallisiertes Glutathion keine erhöhte Sauerstoff-Aufnahme eines auf besondere Weise bereiteten Muskelpräparates im Gegensatz zu den früheren Versuchen mit nicht einheitlichen Glutathion-Präparaten verursachen kann.

Ergebnisse der allerletzten Zeit zeigen, daß SH-Verbindungen auch bei den wichtigen hydrolytischen Spaltungen von Eiweißstoffen eine große Rolle spielen<sup>8)</sup>. So hat z. B. Waldschmidt-Leitz<sup>9)</sup> festgestellt, daß die Zookinase, wie man bisher den Aktivator der katheptischen Enzyme Kathepsin und Carboxy-Polypeptidase nannte, mit Glutathion identisch ist.

Einfache Modellversuche zur Klärung der Frage nach der Teilnahme von SH-Verbindungen bei Oxydationen mit molekularem Sauerstoff sind recht wenig ausgeführt worden. Da Meyerhof glaubt, daß bei der Sauerstoff-Übertragung auf Muskulatur hier vornehmlich die ungesättigten Fettsäuren des Lecithins als Substrate dienen, wurden vor allem Linolensäure, Linolsäure, Leinölsäure und das Lecithin selbst im Modellversuch studiert<sup>10)</sup>. Das Ergebnis der Untersuchungen läßt sich dahin zusammenfassen, daß die untersuchten SH-Verbindungen Glutathion, Cystein und Thio-glykolsäure eine erhöhte Sauerstoff-Aufnahme der genannten Systeme bewirken. Die theoretische Erklärung, die Meyerhof zunächst der katalytischen Wirkung von SH-Verbindungen gab, erscheint vom chemischen Standpunkt aus recht unbefriedigend. Meyerhof nimmt intermediär die Bildung eines aktiven Peroxydes der SH-Verbindung an, das dann unter Rückbildung der SH-Verbindung als eigentliches Oxydationsmittel dem Substrat gegenüber dient, und v. Szent-Györgyi<sup>11)</sup> wollte sogar für die Zwischenbildung dieses Peroxydes experimentelle Beweise erbracht haben, mußte aber dann selbst seine Versuche widerrufen<sup>12)</sup>. Auch Wieland und Franke<sup>13)</sup> haben sich mit der Oxydation von Linolensäure, Leinölsäure und Lecithin unter Zusatz von Thio-glykolsäure beschäftigt. Auf Grund seiner Modellversuche will Wieland die von Meyerhof gefundene Beschleunigung der Sauerstoff-Aufnahme von Lecithin und Linolensäure als Schwermetall-Katalyse aufgefaßt wissen, wobei allerdings der Mitwirkung von Thio-glykolsäure erhebliche Bedeutung zukommen soll. Wieland und Franke untersuchten ferner noch die Beschleunigung der durch Eisensalze bewirkten Oxydation von Ameisensäure, Milchsäure, Weinsäure und

<sup>5)</sup> F. G. Hopkins, Journ. biol. Chem. **84**, 269 [1929].

<sup>6)</sup> E. C. Kendall, B. F. Mc Kenzie, H. L. Mason, Journ. biol. Chem. **84**, 657 [1929]. <sup>7)</sup> N. U. Meldrum, M. Dixon, Biochem. Journ. **24**, 472 [1930].

<sup>8)</sup> W. Graßmann, H. Dykerhoff, O. v. Schoenebeck, Ztschr. physiol. Chem. **186**, 183 [1930]; H. A. Krebs, Biochem. Ztschr. **220**, 289 [1930]; Waldschmidt-Leitz, Naturwiss. **1930**, 952. <sup>9)</sup> Waldschmidt-Leitz, Naturwiss. **1930**, 644.

<sup>10)</sup> Meyerhof, Hopkins, Meldrum u. Dixon, loc. cit.; E. N. Allott, Biochem. Journ. **20**, 957; A. v. Szent-Györgyi, Biochem. Ztschr. **146**, 245 [1924].

<sup>11)</sup> A. v. Szent-Györgyi, Biochem. Ztschr. **146**, 254 [1924].

<sup>12)</sup> A. v. Szent-Györgyi, Biochem. Ztschr. **149**, 188 [1924].

<sup>13)</sup> H. Wieland u. W. Franke, A. **464**, 101 [1928].

unterphosphoriger Säure durch Sauerstoff bei Thio-glykolsäure-Zusatz. Jedoch scheinen uns die von Wieland beobachteten Oxydations-Katalysen nicht für die SH-Verbindung spezifisch zu sein, da diese durch Dioxy-malein- und Dioxy-weinsäure ersetzt werden kann. Die Auswahl der im Modellversuch verwandten Substanzen kann, was die theoretische Klarstellung der katalytischen Wirkungsweise von SH-Verbindungen betrifft, nicht als sehr günstig bezeichnet werden. Es schien uns vor allem nötig, solche Oxydationen mit molekularem Sauerstoff aufzusuchen, die in einheitlichem Reaktionsverlauf zu einem einheitlichen Oxydationsprodukt führen und sich in homogener Lösung abspielen, selbst auf die Gefahr hin, daß man sich mit diesen beiden Forderungen zunächst von biologischen Versuchs-Bedingungen weit entfernen würde.

Uns diene als Modellversuch die durch Vermittlung eines Cu(II)-Salzes bewirkte Oxydation von Leuko-methylenblau durch molekularen Sauerstoff. Gleichzeitig hat sich auch Reid im Warburgschen Institut mit dieser Reaktion beschäftigt. In seiner ersten Mitteilung zeigte Reid<sup>14)</sup>, daß die vermeintliche Oxydation von Leuko-methylenblau in Wirklichkeit eine Metall-Katalyse ist, und daß Spuren von Cu-Salzen für die längst bekannte Sauerstoff-Aufnahme von Leuko-methylenblau-Lösungen verantwortlich zu machen sind. Näher experimentell belegt hat es Reid allerdings zunächst nur an dem Beispiel des nahe verwandten Leuko-thionins. Die Versuche mit Leuko-methylenblau sollten uns, wie man an der angedeuteten Problem-Stellung sieht, nur als Mittel zum Zweck dienen, und es zwar zunächst beabsichtigt, vor ihrer Veröffentlichung weitere Ergebnisse der katalytischen Wirkung von SH-Verbindungen abzuwarten. Die Versuche über die Oxydation von Leuko-methylenblau lagen bereits vollständig abgeschlossen vor, als eine zweite Arbeit von Reid erschien, in der Reid auf Veranlassung von O. Warburg sich auch etwas genauer mit der genannten Oxydation beschäftigte und zu den gleichen Ergebnissen wie wir gelangte<sup>15)</sup>. Wir sehen uns deshalb genötigt, unsere Resultate jetzt schon mitzuteilen, weisen aber darauf hin, daß die vorliegenden Versuche in manchen Punkten der Vervollständigung bedürfen. Die Reidsche Ansicht erhält durch das umfangreichere Material eine sicher willkommene Bestätigung und Erweiterung. Soeben bei Niederschrift dieser Zeilen erschien eine Arbeit von Macrae<sup>16)</sup>, die dieser auf eine Anregung von Wieland im Anschluß an Feststellungen von Wieland und Bertho<sup>17)</sup> über die Autoxydation von Leuko-methylenblau ausführte. Macrae hält die Oxydation noch für eine echte Autoxydation, aber es läßt sich aus seinen angegebenen Versuchs-Bedingungen nicht feststellen, ob nicht doch die Mitwirkung von Spuren von Cu-Salzen (oder anderen Katalysatoren) möglich erscheint.

Die experimentellen Ergebnisse sind so eingeteilt, daß unter A nur orientierende Versuche verzeichnet sind, die bei der Diskussion wenig herangezogen werden und nur die Richtlinien für die exakteren Versuche unter B abzugeben hatten. Bei allen Versuchen wurden 0.1426 g Leuko-methylenblau (=  $\frac{1}{2000}$  Mol), gelöst in 50 ccm Lösungsmittel, in reinem Sauerstoff

<sup>14)</sup> A. Reid, B. 63, 1920 [1930].

<sup>15)</sup> A. Reid, Biochem. Ztschr. 223, 487 [1930]; s. auch O. Warburg, Biochem Ztschr. 227, 246 Anm. 2 [1930].

<sup>16)</sup> Th. F. Macrae, B. 64, 133 [1931].

<sup>17)</sup> H. Wieland, A. Bertho, A. 467, 131 [1928].

geschüttelt. Die Sauerstoff-Aufnahme wurde durch Zugabe von Cu(II)-Acetat bewirkt, dessen Konzentration so gewählt wurde, daß eine ziemlich rasche Sauerstoff-Aufnahme erfolgte. Cu(II)-Acetat war in den Versuchen  $2 \times 10^{-5}$ -molar. Wenn 1 Mol Leuko-methylenblau nur  $\frac{1}{2}$  Mol Sauerstoff absorbiert, müßten 5.6 ccm Sauerstoff aufgenommen werden, bei 1 Mol Sauerstoff dagegen 11.2 ccm. In welcher Weise die Cu(II)-Acetat-Konzentration die Oxydations-Geschwindigkeit beeinflusst, zeigt Fig. 1 (die Kurven der Figuren tragen die entsprechenden Versuchsnummern des experimentellen Teiles!). Das Ergebnis ist ohne weiteres abzulesen und zeigt sich besonders deutlich bei dem Vergleich der Zeiten, die zur Aufnahme von 5.6 ccm Sauerstoff (Halbwerts-Zeit) nötig sind. Kurve I gibt das Resultat eines Versuches mit käufl. Merckschen Eisessig (98—100-proz.) als Lösungsmittel wieder, dem kein Cu(II)-Acetat zugesetzt war. Es ergab sich hieraus die Notwendigkeit besonderer Vorbehandlung der verwendeten Lösungsmittel, da z. B. in einem Eisessig, der aus Quarz destilliert war, fast keine Oxydation erfolgte.

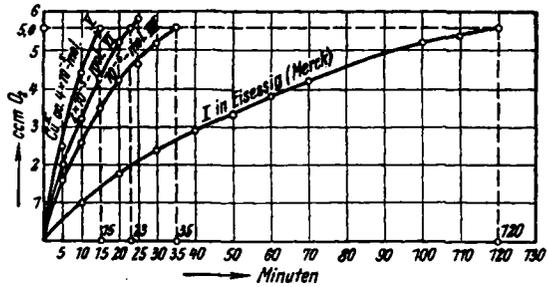


Fig. 1. Einfluß d. Cu(II)-Acetat-Konzentrat.

Schon die ersten Versuche zeigten, daß Leuko-methylenblau bei der Oxydation viel mehr Sauerstoff aufnimmt als  $\frac{1}{2}$  Mol pro Mol Leuko-farbstoff entspricht, so daß bei dieser Cu-Katalyse die Bildung von Wasserstoffsperoxyd angenommen werden mußte, wie dies auch Reid (loc. cit.) getan hat. Reid hat Wasserstoffsperoxyd manometrisch und qualitativ nachgewiesen. Desgleichen ist Macrae einwandfrei der Nachweis von Wasserstoffsperoxyd bei seiner „Autoxydation“ ohne Cu-Salz-Zusatz geglückt.

Auf die Festlegung des Verlaufes der Sauerstoff-Absorption im eigentlichen Modellversuch (IX, Fig. 2) war besondere Sorgfalt zu verwenden, da mit ihm alle anderen Versuche mit Zusätzen der verschiedensten Art verglichen werden mußten. Er wird im folgenden kurz als „Normalversuch“ bezeichnet. Bei der raschen Sauerstoff-Aufnahme ist es fast selbstverständlich, daß man sich durch Versuche (VIII und IX) davon überzeugte, daß die gewählte Schüttel-Geschwindigkeit des Reaktionsgefäßes die dauernde Sättigung der

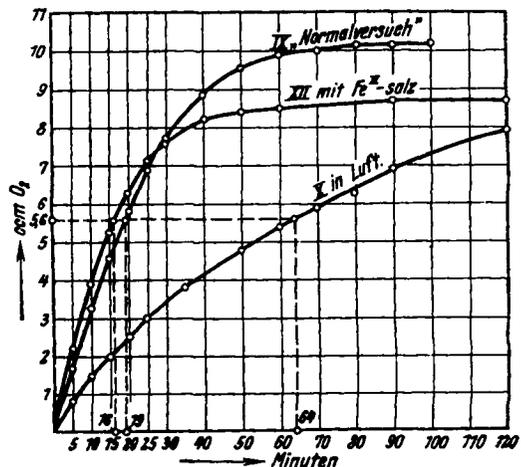


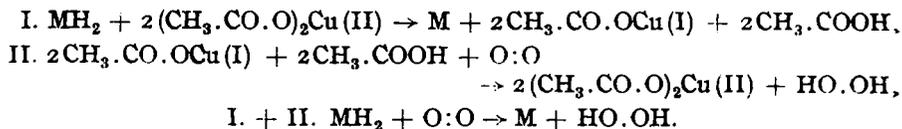
Fig. 2.

Lösung mit Sauerstoff gewährleistet. Die Oxydations-Dauer im „Normalversuch“ beträgt 70–80 Min., die Halbwerts-Zeit 19 Min. Der gesamte Sauerstoff-Verbrauch von 10.2 ccm bleibt hinter der 1 Mol Sauerstoff entsprechenden Menge von 11.2 ccm zurück. Es sind nur 91% des zuletzt genannten Volumens aufgenommen worden. Dieses Ergebnis wird dadurch erklärt, daß Wasserstoffsuperoxyd Leuko-methylenblau, wenn auch langsam, zu oxydieren vermag<sup>18)</sup>. Man hat also bei der Oxydation von Leuko-methylenblau durch O<sub>2</sub> eine primäre und eine sekundäre Reaktion zu unterscheiden. Die primäre Reaktion besteht in der durch Cu(II)-Acetat bewirkten Übertragung von O<sub>2</sub> auf Leuko-methylenblau, und daran schließt sich als sekundäre Folge-Reaktion die Oxydation von noch vorhandenem Leuko-farbstoff durch gebildetes Wasserstoffsuperoxyd an. Die aufgenommene Sauerstoff-Menge hängt von dem Verhältnis der Geschwindigkeiten dieser beiden Reaktionen ab.

Schon seit langer Zeit ist die starke Aktivierung von Wasserstoffsuperoxyd durch Ferrosalze bekannt und wird praktisch viel verwendet<sup>19)</sup>. Es zeigte sich, daß auch im vorliegenden Fall die Oxydation von Leuko-methylenblau durch Wasserstoffsuperoxyd durch Ferrosalz-Zusatz außerordentlich beschleunigt wird. Diese Feststellung war die Veranlassung zur Wiederholung des „Normalversuches“ unter Zugabe von Mohrschem Salz (XI u. XII, Fig. 2). Das Ferro-Salz sollte eine Erhöhung der Geschwindigkeit der sekundären Reaktion und damit einen geringeren Sauerstoff-Verbrauch bewirken. Die Versuche zeigten das erwartete Ergebnis, da in 2 Bestimmungen nur 8.7 ccm O<sub>2</sub> aufgenommen wurden (= 78% des für 1 Mol ber. O<sub>2</sub>-Volumens), mithin 1.5 ccm weniger als im „Normalversuch“. Wasserstoffsuperoxyd ist damit indirekt nachgewiesen. Die Versuche mit Ferro-Salz verdienen wegen der verschiedenen Mitwirkung zweier Metalle Beachtung. Es ist nicht ausgeschlossen, daß auch bei anderen Oxydationen mit molekularem Sauerstoff Cu und Fe in ähnlicher Weise beteiligt sind. Die beiden Schwermetalle bewirken zusammen eine erhöhte „Sauerstoff-Ausnutzung“. Wie man aus dem zeitlichen Verlauf der O<sub>2</sub>-Absorption erkennt, ist die „Aktivierung“ des Sauerstoffs durch Ferro-Ionen gering, vor allem, wenn man die im Vergleich zur Cu(II)-Acetat-Konzentration hohe Ferrosalz-Konzentration beachtet. Die Cupri-Ionen „aktivieren“ den molekularen Sauerstoff, die Ferro-Ionen das Wasserstoffsuperoxyd.

Wenn man im „Normalversuch“ bei sonst gleichen Bedingungen den Sauerstoff-Druck dadurch verringert, daß in Luft statt in reinem O<sub>2</sub> bei Atmosphären-Druck geschüttelt wird, erfolgt die O<sub>2</sub>-Aufnahme viel langsamer (X, Fig. 2). Die längere Reaktionsdauer verursacht dann ein starkes Hervortreten der sekundären Reaktion, woraus ein um 1.4 ccm geringerer O<sub>2</sub>-Verbrauch resultiert. Es wurden hier nur 8.8 ccm O<sub>2</sub> (= 78.5% der für 1 Mol berechn. O<sub>2</sub>-Menge) statt 10.2 ccm im „Normalversuch“ absorbiert.

Die durch Cu(II)-Acetat vermittelte Oxydation von Leuko-methylenblau (MH<sub>2</sub>) durch molekularen O<sub>2</sub> formulieren wir in folgender Weise:



<sup>18)</sup> siehe H. Wieland, F. Macrae, A. 483, 238 [1930] u. Macrae, loc. cit.

<sup>19)</sup> vergl. H. Wieland, W. Franke, A. 457, 1 [1927].

Cu(II)-Acetat ist mithin das eigentliche Oxydationsmittel. Die experimentelle Grundlage für die Formulierung der Reaktion ist dadurch gegeben, daß Leuko-methylenblau durch Cu(II)-Acetat sofort glatt zum Farbstoff oxydiert wird. Die Reaktions-Geschwindigkeit wird durch Gleichung II bestimmt. Die Empfindlichkeit von Cuproacetat gegen  $O_2$ , besonders in essigsaurer Lösung, ist bekannt<sup>20)</sup>. Da die Bildung von Wasserstoffsperoxyd nachgewiesen ist, muß es bei der Oxydation von Cupro- zu Cupri-acetat entstehen. Engler<sup>21)</sup> nimmt bei der Luft-Oxydation von Cerosalzen z. B. ebenfalls die intermediäre Bildung von Wasserstoffsperoxyd an. Wegen der sehr geringen Cu(II)-Acetat-Konzentration, wodurch die Oxydation den Charakter einer katalytischen Reaktion erhält, müssen sich die Vorgänge nach den Gleichungen I und II so lange wiederholen, bis der gesamte Leuko-farbstoff oxydiert ist. Die Verwendung eines Modell-Versuches mit Schwermetall-Katalyse wurde veranlaßt durch die Bedeutung, die der Mitwirkung von Schwermetallen, insbesondere von Eisen, bei Oxydations-Vorgängen im Organismus heute zugeschrieben wird. Das Vorkommen von Cu-Salzen in Geweben ist lange bekannt, und Warburg<sup>22)</sup> zeigte, daß sie sogar als regelmäßiger Bestandteil im menschlichen Blutserum enthalten sind.

Als nun die Oxydation von Leuko-methylenblau unter Zusatz von SH-Verbindungen untersucht wurde, zeigte sich das überraschende Resultat, daß diese Verbindungen nicht nur keine Beschleunigung, sondern sogar eine ausgesprochene Hemmung der  $O_2$ -Aufnahme bewirken. Man hatte in den SH-Verbindungen stark wirkende Anti-katalysatoren gefunden. Bis jetzt sind Cystein, Cystein-Chlorhydrat und Glutathion untersucht, die ein völlig analoges Verhalten zeigen. Man darf hierin den Beweis erblicken, daß es sich um eine spezifische Wirkung der SH-Gruppe handelt. Cystein und Cystein-Chlorhydrat unterscheiden sich auch quantitativ nur wenig. Es hat sich als sehr nützlich erwiesen, die Reaktions-Geschwindigkeit eines Versuches durch möglichst viele Beobachtungen genau festzulegen. Um Einblick in den Mechanismus der hemmenden Wirkung der SH-Verbindungen zu erhalten, ist die Konzentration der Zusätze innerhalb weiter Grenzen in bezug auf die Katalysator - Konzentration (Cu(II)-Acetat) variiert worden. Die Resultate sind in Fig. 3 dargestellt.

Als nun die Oxydation von Leuko-methylenblau unter Zusatz von SH-Verbindungen untersucht wurde, zeigte sich das überraschende Resultat, daß diese Verbindungen nicht nur keine Beschleunigung, sondern sogar eine ausgesprochene Hemmung der  $O_2$ -Aufnahme bewirken. Man hatte in den SH-Verbindungen stark wirkende Anti-katalysatoren gefunden. Bis jetzt sind Cystein, Cystein-Chlorhydrat und Glutathion untersucht, die ein völlig analoges Verhalten zeigen. Man darf hierin den Beweis erblicken, daß es sich um eine spezifische Wirkung der SH-Gruppe handelt. Cystein und Cystein-Chlorhydrat unterscheiden sich auch quantitativ nur wenig. Es hat sich als sehr nützlich erwiesen, die Reaktions-Geschwindigkeit eines Versuches durch möglichst viele Beobachtungen genau festzulegen. Um Einblick in den Mechanismus der hemmenden Wirkung der SH-Verbindungen zu erhalten, ist die Konzentration der Zusätze innerhalb weiter Grenzen in bezug auf die Katalysator - Konzentration (Cu(II)-Acetat) variiert worden. Die Resultate sind in Fig. 3 dargestellt.

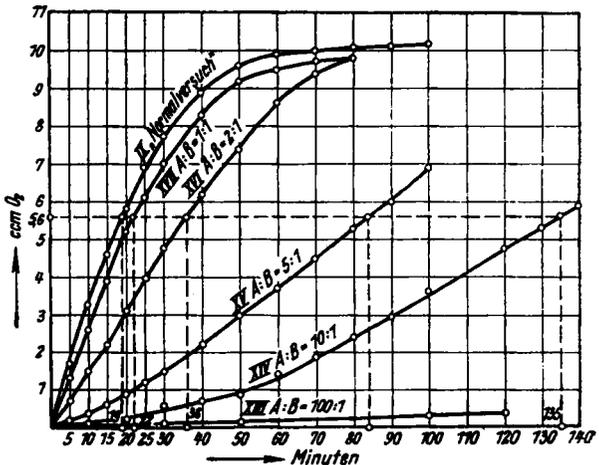


Fig. 3. Cystein-Chlorhydrat als Anti-katalysator (mol. Konzentrat. von Cystein-Chlorhydrat = A, von Cu(II)-Acetat = B).

<sup>20)</sup> Péchard, Compt. rend. Acad. Sciences **136**, 505 [1903].

<sup>21)</sup> C. Engler, B. **36**, 2642 [1903], **37**, 49, 3269 [1904].

<sup>22)</sup> O. Warburg, Biochem. Ztschr. **187**, 255, **190**, 143 [1927].

tate mit Cystein-Chlorhydrat und Cystein sind in den Fig. 3 und 4, die mit Glutathion in der Fig. 5 enthalten. Mit der Verringerung der Konzentra-

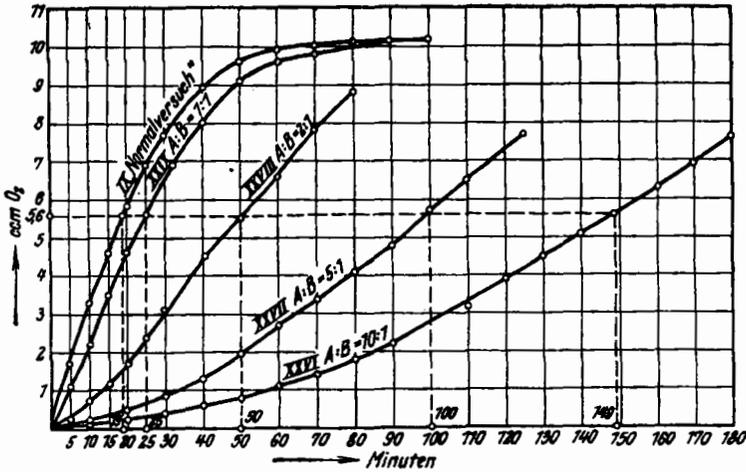


Fig. 4. Cystein als Anti-katalysator  
(mol. Konzentrat. von Cystein = A, von Cu(II)-Acetat = B).

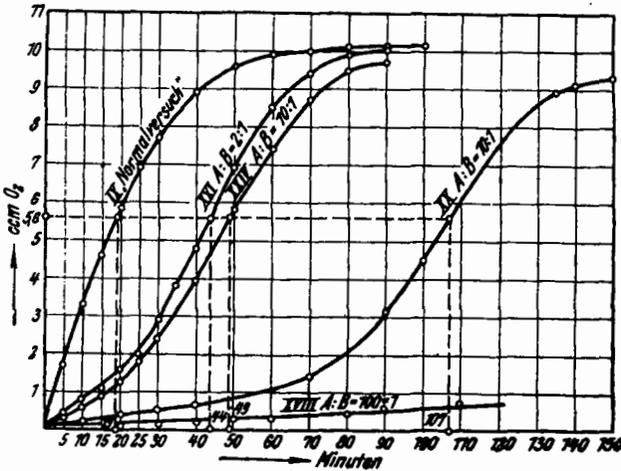


Fig. 5. Glutathion als Anti-katalysator  
(mol. Konzentrat. von Glutathion = A, von Cu(II)-Acetat = B).

tion der SH-Verbindungen nimmt auch die hemmende Wirkung ab. Dies zeigt am besten folgende Zusammenstellung über die Halbwerts-Zeiten:

SH-Verbindung	Verhältn. d. mol. Konzentrat. von SH-Verb. zum Cu(II)-Acetat				
	100:1	10:1	5:1	2:1	1:1
Cystein-Chlorhydrat . . .	sehr groß	135	84	36	22
Cystein . . . . .	—	149	100	50	25
Glutathion . . . . .	sehr groß	107	—	44	—

Man kann die im „Normalversuch“ ziemlich rasche O<sub>2</sub>-Aufnahme durch Zusatz von SH-Verbindungen fast vollständig zurückdrängen. Durch Änderung der Konzentration der SH-Verbindungen besteht ferner die Möglichkeit zur Einstellung einer bestimmten Reaktions-Geschwindigkeit. Die unerwarteten Eigenschaften der SH-Verbindungen und der noch zu besprechende Mechanismus der SH-Anti-katalyse im vorliegenden Fall waren die Veranlassung zu vielfacher Kontrolle. Cystein-Chlorhydrat-Präparate verschiedener Herkunft zeigten das gleiche Verhalten. Es war uns außerdem sehr erwünscht, die Resultate mit Glutathion mit einem im Laboratorium von Prof. F. G. Hopkins, Cambridge, selbst hergestellten Präparat bestätigen zu können<sup>23)</sup>.

Die in der Zeit-Einheit im „Normalversuch“ absorbierte O<sub>2</sub>-Menge nimmt erwartungsgemäß mit fortschreitender Reaktion ab, was sich in der graphischen Darstellung dadurch kenntlich macht, daß die Kurve konkav gegen die x-Achse geneigt ist. Die Kurven dagegen, die die O<sub>2</sub>-Absorption bei Zusatz von SH-Verbindungen in wechselnder Konzentration wiedergeben (XIV, XV, XVI in Fig. 3; XX, XXI, XXIV in Fig. 5; XXVI, XXVII, XXVIII in Fig. 4) sind deutlich bis zur Aufnahme von 5.6 ccm O<sub>2</sub> konvex gegen die x-Achse geneigt (mit Ausnahme der Kurven XIII, XVII in Fig. 3; XVIII in Fig. 5 und XXIX in Fig. 4, die später besprochen werden). Daraus folgt, daß bei diesen Versuchen, im Gegensatz zum „Normalversuch“, die Reaktions-Geschwindigkeit ständig zunimmt. Ganz besonders drastisch kommt die Steigerung der Reaktions-Geschwindigkeit nach anfänglich starker Hemmung der Oxydation in einem Versuch mit Glutathion-Zusatz zum Ausdruck, in welchem das molare Verhältnis von Glutathion zu Cu(II)-Acetat 10 : 1 beträgt (XX, Fig. 5), und der deshalb hervorgehoben sein mag. Hier sind in 70 Min., in welcher Zeit im „Normalversuch“ bereits vollständige Oxydation eingetreten ist, nur 1.4 ccm O<sub>2</sub> aufgenommen worden. Dann setzt aber auch in diesem Versuch fast schlagartig eine starke O<sub>2</sub>-Aufnahme ein, wobei die Reaktions-Geschwindigkeit des „Normalversuches“ bald erreicht wird. Aus dem Kurven-Verlauf (Fig. 5) ist dies ohne weiteres ersichtlich. Glutathion vermochte also nur eine gewisse Zeit lang eine „konservierende“ Wirkung auszuüben.

Die Geschwindigkeits-Zunahme im Laufe der Oxydation ist nur durch eine mit der Reaktion einhergehende Zerstörung des Anti-katalysators zu erklären. Diese allmähliche Ausschaltung der SH-Verbindungen bewirkt das während der Oxydation entstehende Wasserstoffsperoxyd. Der molekulare Sauerstoff kommt dafür nicht in Betracht, da SH-Verbindungen in saurer Lösung durch ihn nicht oxydiert werden<sup>24)</sup>. Die Einwirkung von Wasserstoffsperoxyd braucht nun nicht gleich zu einer Zerstörung des gesamten Moleküls führen, Wasserstoffsperoxyd greift vielmehr an der reaktionsfähigen SH-Gruppe an. Es erfolgt Oxydation der SH-Verbindungen zu den entsprechenden Disulfiden. Wie wir finden, wird Cystein durch Wasserstoffsperoxyd in essigsaurer Lösung bei gewöhnlicher Temperatur rasch zu Cystin oxydiert. Schon Abderhalden und Wertheimer zeigten die

<sup>23)</sup> Für die freundliche Überlassung des Glutathion-Präparates sprechen wir auch an dieser Stelle Hrn. Prof. Hopkins unsern verbindlichsten Dank aus.

<sup>24)</sup> A. P. Mathews, S. Walker, Journ. biol. Chem. 6, 299 [1909]; vergl. Arch. Physiol. 197, 131 [1923], 200, 203 [1923].

große Empfindlichkeit von Cystein gegen Wasserstoffsperoxyd<sup>25)</sup>. Die Oxydation von Glutathion durch Wasserstoffsperoxyd steht noch aus; sie soll aber durchgeführt werden<sup>26)</sup>. Die entwickelte Anschauung über die Ausschaltung des Anti-katalysators durch Wasserstoffsperoxyd fordert, daß die entstehenden Disulfide keine Hemmung der Oxydation bewirken dürfen. Diese Frage war dem Experiment zugänglich. Es zeigte sich in der Tat, daß Cystin im Vergleich zu Cystein nur eine sehr schwache anti-katalytische Wirkung ausübt (XXX und XXXI, Fig. 6). Bei einem

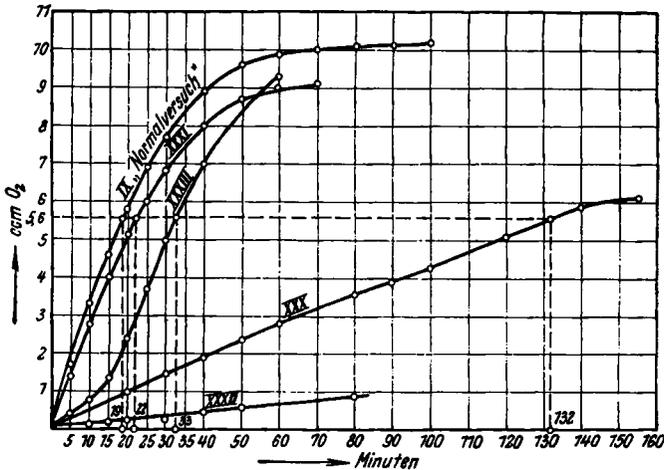


Fig. 6. Cystin- und Blausäure-Zusatz.

Verhältnis der molaren Konzentration von Cystin zu Cu(II)-Acetat von 10:1 wurde eine Halbwerts-Zeit von 22 Min. beobachtet, während die entsprechenden Werte für die Versuche mit Cystein bzw. Glutathion 149 bzw. 107 Min. sind. Es ist also gezeigt, daß die Oxydation von SH-Verbindungen zu den Disulfiden die Aufhebung der anti-katalytischen Wirkungen erklären kann. Es ist beabsichtigt, die entsprechenden Versuche auch mit der Disulfid-Form von Glutathion zur Kontrolle anzustellen. Vorversuche, die in gleicher Richtung wie mit Cystin weisen, sind bereits ausgeführt. Es zeigte sich nämlich ein deutlicher Unterschied im Wirkungsgrad zweier Glutathion-Präparate, von denen das eine frisch dargestellt war, das andere jedoch schon 6 Monate ohne besondere Vorsichtsmaßregeln aufbewahrt wurde und infolgedessen teilweise zum Disulfid oxydiert war. Bei nicht zu hoher Glutathion-Konzentration erweist sich das ältere Präparat als viel weniger anti-katalytisch wirksam (XXIV, Fig. 5)<sup>27)</sup>.

Die SH-Verbindungen können durch die störende Tätigkeit des Wasserstoffsperoxydes bei der Oxydation von Leuko-methylenblau ihre volle Hemmungsfähigkeit nicht zeigen, wir halten diese jedoch auf Grund unserer Erfahrungen für sehr groß. Wasserstoffsperoxyd „vergiftet“ die Anti-

<sup>25)</sup> E. Aberhalden, E. Wertheimer, Arch. Physiol. **199**, 336 [1923].

<sup>26)</sup> Kendall u. Mitarbeiter (loc. cit.) haben Glutathion mit  $H_2O_2$  oxydativ abgebaut.

<sup>27)</sup> vergl. XXIV mit XX in Fig. 5!

katalysatoren. Die Kenntnis der Wirkungsweise von Wasserstoffsperoxyd ermöglicht jetzt auch ein besseres Verständnis für die Versuche mit den höchsten bzw. den niedrigsten Konzentrationen der SH-Verbindungen. Bei einer so geringen molaren Konzentration der SH-Verbindung von  $2 \times 10^{-5}$  ist in sehr kurzer Zeit die zur Oxydation nötige Menge von Wasserstoffsperoxyd gebildet, so daß fast keine Hemmung mehr eintritt (XVII in Fig. 3, XXIX in Fig. 4). Das gerade Gegenteil liegt bei den Versuchen mit relativ hoher Konzentration der SH-Verbindung vor ( $2 \times 10^{-3}$ -mol. in XIII, XVIII und XXII;  $10^{-3}$ -mol. in XIX und XXIII).

Zur Erklärung der SH-Anti-katalyse wurde zunächst die Deutung von Titoff<sup>28)</sup> herangezogen, daß die Wirkung negativer Katalysatoren einfach in der Unwirksam-machung stark positiver Katalysatoren bestünde. Für diese Annahme hat in neuester Zeit Bodenstein<sup>29)</sup> einen schönen Beweis erbracht, indem er damit die günstige Wirkung des Leim-Zusatzes bei der Raschigschen Hydrazin-Darstellung erklärte. Man kann annehmen, daß die SH-Verbindungen die katalytisch wirksamen Cupri-Ionen in einen Komplex einschließen und so ihrer Tätigkeit entziehen. Eine noch vorhandene Rest-Oxydation würde dann nur von der im allgemeinen geringen Dissoziation der entstandenen Komplexverbindung bedingt sein. Nun werden bekanntlich sogar schon die Cuprisalze von Amino-säuren als innerkomplexe Salze aufgefaßt<sup>30)</sup>. Ihre elektrolytische Dissoziation macht sich erst in sehr starker Verdünnung bemerkbar<sup>31)</sup>. Die Bildung von komplexen Cuprisalzen von SH-Verbindungen bei den fraglichen Versuchen erscheint möglich. Diese müssen aber dann sicher, da es sich um sehr große Verdünnungen handelt, weitgehend elektrolytisch gespalten sein. Die Dissoziation der Komplexsalze müßte den Bedingungen des chemischen Massenwirkungs-Gesetzes gehorchen, wonach eine Erhöhung der Konzentration der SH-Verbindung eine Verringerung der Cupri-Ionen-Konzentration bewirken muß und umgekehrt. Diese Bedingung erscheint nun tatsächlich erfüllt zu sein, da mit steigender Konzentration der SH-Verbindung die Geschwindigkeit der O<sub>2</sub>-Aufnahme fällt, mithin die wirksame Cupri-Ionen-Konzentration ebenfalls abnimmt. Für die gegebene Erklärung der SH-Anti-katalyse sprechen die Versuche mit Blausäure-Zusatz (XXXII u. XXXIII, Fig. 6). Blausäure, deren komplex-bildende Fähigkeiten bekannt sind, hemmt ebenfalls die durch Cupriacetat vermittelte Oxydation von Leuko-methylenblau durch O<sub>2</sub>. Wieland und Bertho (loc. cit.), sowie Macrae (loc. cit.) finden bei ihrer „Autoxydation“ von Leuko-methylenblau keine Hemmung durch Blausäure.

Etwas erstaunlich sind in diesem Zusammenhang die Versuche mit Cystin-Zusatz. Man hätte auch von Cystin vermuten können, daß es ebenso wie Cystein vermöge seiner Fähigkeit zur Bildung eines innerkomplexen Cuprisalzes eine ähnliche anti-katalytische Wirkung wie dieses entfalten müsse. Mit Cystin wurde jedoch nur eine geringe Hemmung erzielt. Sie macht sich erst bei sehr hoher Cystin-Konzentration bemerkbar (XXX, Fig. 6), ist aber dann ebenfalls deutlich vorhanden. Man muß deshalb annehmen,

<sup>28)</sup> A. Titoff, Ztschr. physikal. Chem. **45**, 641 [1903].

<sup>29)</sup> M. Bodenstein, Ztschr. physikal. Chem. (A) **189**, 397 [1928].

<sup>30)</sup> siehe R. Weinland, „Einführung in d. Chemie d. Komplexverbindungen“, II. Aufl., S. 360.

<sup>31)</sup> Über Komplikationen durch Hydrolyse in sehr stark verdünnter wäßriger Lösung s. Ley u. Arends, Ztschr. physiol. Chem. **192**, 131 [1930].

daß der Cystin-Komplex stärker elektrolytisch dissoziiert ist als der Cystein-Komplex und infolgedessen zur Zurückdrängung der Cupri-Ionen einer höheren Cystin-Konzentration bedarf. Der große Unterschied zwischen Cystin und Cystein erscheint uns nicht ohne weiteres verständlich und beeinträchtigt nach unserer Meinung die oben gegebene Erklärung der SH-Antikatalyse. Eine zweite Erklärungs-Möglichkeit kann an die Annahme anknüpfen, daß es sich um eine spezifische Wirkung der SH-Gruppe handelt, die im Zusammenhang mit dem nach dem Oxydations-Mechanismus nötigen Wechsel der Wertigkeits-Stufe von Cu stehen könnte. Dies muß erst durch weitere Versuche geklärt werden. Es ist beabsichtigt, die anti-katalytische Wirkung von SH-Verbindungen bei Oxydationen mit molekularem  $O_2$  an weiteren Beispielen zu studieren. Vor allem sollen auch biologische Oxydationsprozesse untersucht werden, da die Mitwirkung von SH-Verbindungen in dem entwickelten Sinn durchaus möglich erscheint.

Hrn. Geheimrat Dimroth spreche ich für das Interesse, das er der Arbeit entgegenbrachte, meinen herzlichsten Dank aus.

### Beschreibung der Versuche.

Leuko-methylenblau erhielt man nach Landauer und Weil<sup>32)</sup> durch Reduktion von Methylenblau mit Phenyl-hydrazin. Das Rohprodukt wurde aus Petroläther umkrystallisiert. Der reine Leuko-farbstoff, der in gelben Nadeln krystallisiert, ist im Vakuum über  $CaCl_2$  und KOH tagelang unverändert aufzubewahren. Die Darstellung von Cystin erfolgte auf Grund der vielen, in der Literatur zerstreuten Beobachtungen und Erfahrungen durch Hydrolyse von Schweine-Borsten. Die Reinigung geschah durch 2-maliges Ausfällen aus salzsaurer Lösung mit NaOH nach dem Vorbild von Mathews und Walker<sup>33)</sup>. Molekulares Drehungsvermögen  $[\alpha]_{577}^{21} = -221^{\circ}$  (in  $n$ -HCl). In einer Reihe von Versuchen wurden aus 1 kg Borsten etwa 30 g reines Cystin erhalten. Cystein-Chlorhydrat erhielt man nach der Methode von Baumann<sup>34)</sup> in Anlehnung an die Angaben von Friedmann<sup>35)</sup>. Das Chlorhydrat wird 2-mal nach Bergmann und Michalis<sup>36)</sup> aus 5-n. HCl umgelöst. Es krystallisiert mit 1 Mol.  $H_2O$ ; man muß es luft-trocken zur Herstellung der Lösungen verwenden, da die Krystalle über  $H_2SO_4$  verwittern. Die Prüfung auf Reinheit geschah durch Titration mit  $n/10$ -Jod-Lösung (0.000 g luft-trocknes Chlorhydrat verbrauchten bei der Titration im Mittel aus 4 Versuchen 5.8 ccm  $n/10$ -Jod-Lösung statt der berechn. 5.7 ccm). Krystallisiertes Glutathion (SH-Form) wurde nach Hopkins (loc. cit.) dargestellt. Das Cupriacetat war aus verd. Essigsäure umkrystallisiert.

Methylenblau wird von salzsaurem Cystein in essigsaurer Lösung nicht reduziert. Wenn dieses Ergebnis auch auf Grund von Literatur-Angaben zu erwarten war<sup>37)</sup>, so war eine Bestätigung durch den Versuch doch erwünscht. Man füllte in 2 Thunberg-Rohre je 2 ccm  $mol/1000$ -Methylenblau-Lösung in Eisessig und setzte je 4 ccm  $mol/1000$ -Cystein-Chlorhydrat-Lösung in  $n/10$ -Essigsäure zu. Die Rohre wurden an der Wasserstrahl-Pumpe evakuiert und in einen Thermostaten von  $25^{\circ}$  gesetzt. Die Farbstärke blieb tagelang erhalten (Beobachtungs-Dauer 7 Tage!).

<sup>32)</sup> P. Landauer, H. Weil, B. 43, 198 [1909]; A. Reid, loc. cit.

<sup>33)</sup> loc. cit. <sup>34)</sup> E. Baumann, Ztschr. physiol. Chem. 8, 299 [1883].

<sup>35)</sup> E. Friedmann, Beitr. Physiol. Pathol. 4, 504 [1904].

<sup>36)</sup> M. Bergmann, G. Michalis, B. 63, 987 [1930].

<sup>37)</sup> Fr. Hasse, Biochem. Ztschr. 98, 159 [1919]; S. Toda, Biochem. Ztschr. 172,

### Einwirkung von Wasserstoffsuroxyd auf Leuko-methylenblau (MH<sub>2</sub>).

Qualitative Versuche: In 2 graduierte Reagensgläser (I und II) füllte man je 2 ccm einer mol/100-Leuko-methylenblau-Lösung in Eisessig und außerdem je 2 ccm einer mol/100-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung in Wasser (die Lösungsmittel waren aus Quarz destilliert). Zu II setzte man 1 Tropfen einer mol/1000-Mohrschen Salzlösung in H<sub>2</sub>O. Die Lösung in II ist in wenigen Minuten vollständig durchoxydiert, während in derselben Zeit die Lösung in I nur schwach anoxydiert ist. Der Unterschied ist sehr groß. Die Oxydation ohne Ferrosalz-Zusatz schreitet langsam voran, ist aber immerhin deutlich wahrnehmbar.

Oxydation von MH<sub>2</sub> durch Cupriacetat: Als Lösungsmittel diente aus Quarz destillierter Eisessig, den man gut auskochte und mit CO<sub>2</sub> sättigte. 0.0399 g Cu(II)-Acetat wurden durch Erwärmen in 10 ccm Eisessig, 0.0285 g MH<sub>2</sub> kalt ebenfalls in 10 ccm Eisessig gelöst. Die beiden Lösungen wurden kalt im CO<sub>2</sub>-Strom zusammengegeben. Es trat sofort intensive Dunkelblaufärbung auf, d. h. MH<sub>2</sub> wird von Cu(II)-Acetat augenblicklich oxydiert.

Oxydation von Cystein durch Wasserstoffsuroxyd: 0.5 g salzsaures Cystein und 0.4 g kryst. Na-Acetat wurden in 3 ccm Wasser gelöst. Diese Lösung versetzte man mit 3 ccm Eisessig (alle Lösungsmittel aus Quarz destilliert) und ließ dann 2.5 ccm 3-proz. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zutropfen. Bei gewöhnl. Temperatur wurde stehen gelassen. Nach etwa 15 Min. beginnt beim Reiben mit dem Glasstab eine weiße Substanz auszukristallisieren, die nach längerem Stehen abfiltriert wird. Es wurde gut mit Wasser, dann mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. So wurden 0.2256 g Cystin (= 66% d. Th.) isoliert. Die Identifizierung erfolgte durch Bestimmung des Drehungsvermögens. Zu diesem Zwecke löste man die erhaltenen 0.2256 g Cystin in 25 ccm *n*-HCl und bestimmte die Drehung im 1.4-dm-Rohr:

$$[\alpha]_{577}^{19} = - \frac{2,76^{\circ} \cdot 100}{\frac{0.2256}{0.25} \cdot 1.4} = - 218.5^{\circ}$$

Auch hier erfährt das Wasserstoffsuroxyd durch Zusatz einiger Tropfen einer sehr verdünnten Mohrschen Salzlösung eine hohe Aktivierung, die sich so äußert, daß fast sofort nach Zusatz der Wasserstoffsuroxyd-Lösung das Cystin auszukristallisieren beginnt.

### Oxydation von Leuko-methylenblau mit molekularem Sauerstoff.

#### A. Versuche bei Zimmer-Temperatur (orientierende Versuche).

Die Versuche I mit IV wurden in käufl. Eisessig (Merck, 98–100-proz.) bei Zimmer-Temperatur ausgeführt. Die MH<sub>2</sub>-Lösung wurde in einer Schüttel-Ente mit angeschmolzenem Trichter zum Einfüllen sehr lebhaft in reinem O<sub>2</sub> geschüttelt. Bei jedem Versuch wird nur die Reihenfolge der Füllung der Schüttel-Ente ohne verbindenden Text angegeben. Der Leukofarbstoff wurde in den Trichter der Schüttel-Ente gebracht und mit dem Lösungsmittel aus einer Pipette in den Reaktionsraum gespült. Die Konzentration der Reaktions-Teilnehmer ist in Mol pro Liter angegeben. Das aufgenommene O<sub>2</sub>-Volumen las man in einer Gas-Bürette über Wasser ab.

Tabelle I.

Versuchs- Dauer in Min.	O <sub>2</sub> -Verbrauch in ccm (0° u. 760 mm)				I: 10 ccm <i>n</i> -Essigsäure + 0.1426 g MH <sub>2</sub> + 40 ccm Eisessig; b = 747 mm.  II: 10 ccm mol/100-Cystein-Chlorhy- drat in <i>n</i> -Essigsäure + 0.1426 g MH <sub>2</sub> + 40 ccm Eisessig; b = 747 mm.  III: 10 ccm mol/100-Glutathion in <i>n</i> - Essigsäure + 0.1426 g MH <sub>2</sub> + 40 ccm Eisessig.  IV: 10 ccm mol/100-Glutathion in <i>n</i> - Essigsäure + 0.1426 g MH <sub>2</sub> + 30 ccm Eisessig + 10 ccm mol/5000-Cu (II)-Acetat in <i>n</i> /5000-Essigsäure; b = 748 mm.  Die Ergebnisse der Versuche I, II, III u. IV finden sich in der Tabelle I zu- sammengestellt.  In II, III und IV konnten, nachdem das Schütteln in O <sub>2</sub> unter- brochen war, noch beträchtliche Mengen von Leuko-farbstoff durch Oxydation mit Benzochinon nach- gewiesen werden. Dieser Nach- weis gelang in III noch nach 10-tägigem Stehen an der Luft.
	I	II	III	IV	
10	1.0	—	—	—	
20	1.8	—	—	0.3	
30	2.4	0.1	0.1	0.5	
40	2.9	0.2	0.2	0.7	
50	3.3	0.3	0.4	1.0	
60	3.8	0.5	0.5	1.1	
70	4.2	—	—	1.4	
80	—	0.6	0.6	1.6	
90	—	—	—	1.7	
100	5.2	—	—	1.8	
110	5.4	0.7	0.8	1.9	
120	5.6	—	—	2.1	
130	5.7	—	—	—	
140	5.7	1.0	1.1	2.4	
160	—	—	—	2.7	
170	—	1.7	—	—	
180	—	—	—	2.9	
200	—	2.1	—	—	
210	—	—	1.8	3.4	
230	—	—	—	3.7	
250	—	—	—	3.9	
270	—	—	2.1	—	
330	—	—	2.3	—	

### Einfluß der Cu(II)-Acetat-Konzentration auf die Geschwindigkeit der Oxydation von Leuko-methylenblau durch Sauerstoff:

Als Lösungsmittel wurde Eisessig (Merck, zur Anal.) verwendet, der aus Quarz destilliert war.

V: 0.1426 g MH<sub>2</sub> + 40 ccm Eisessig + 10 ccm mol/5000-Cu(II)-Acetat in *n*/5000-Essigsäure; b = 732 mm. Cu(II)-Acetat =  $4 \times 10^{-6}$ -molar.

VI: 0.1426 g MH<sub>2</sub> + 40 ccm Eisessig + 10 ccm mol/10000-Cu(II)-Acetat in *n*/10000-Essigsäure; b = 732 mm. Cu(II)-Acetat =  $2 \times 10^{-5}$ -molar.

VII: 0.1426 g MH<sub>2</sub> + 45 ccm Eisessig + 5 ccm mol/10000-Cu(II)-Acetat in *n*/10000-Essigsäure; b = 738 mm. Cu(II)-Acetat =  $10^{-5}$ -molar.

Figur 1 (S. 549) enthält die Resultate der Versuche V, VI u. VII.

### B. Versuche im Thermostaten.

Auf Grund der gemachten Erfahrungen sind die folgenden Versuche mit exakteren Versuchs-Bedingungen und neuer Versuchs-Anordnung ausgeführt. Das Reaktionsgefäß war eine Schüttel-Ente mit 100 ccm Inhalt aus Jenaer Glas, die in einem Thermostaten von 19.0° in ihrer Längsrichtung geschüttelt wurde. Es wurde darauf geachtet, daß die Zimmer-Temperatur während des Versuches innerhalb 1° konstant blieb, damit die Volumen-Änderung des O<sub>2</sub>-Volumens außerhalb des Thermostaten (ca. 30 ccm) vernachlässigt werden konnte. Die Lösungsmittel (Merckscher Eisessig zur Anal. und dest. Wasser), die man aus einer Quarz-Apparatur destillierte, waren mit O<sub>2</sub> gesättigt. Die Füllung der Schüttel-Ente geschah in der angegebenen Reihenfolge. Nachdem die Anti-katalysator- und MH<sub>2</sub>-Lösung

eingefüllt waren, spülte man die gesamte Apparatur mit reinem  $O_2$  gut durch und schüttelte vor Beginn der Messung ca. 5 Min. Dann erst wurde möglichst rasch die  $Cu(II)$ -Acetat-Lösung zugegeben. Der Beginn des Zugebens der Katalysator-Lösung und der Beginn der Messung lagen bei allen Versuchen 1 Min. auseinander. In allen Versuchen war  $MH_2$   $10^{-2}$ -molar und  $Cu(II)$ -Acetat  $2 \times 10^{-5}$ -molar. Die gewählten Schüttel-Geschwindigkeiten (Schg.) entsprachen dem Ergebnis der Versuche VIII und IX:

„Normalversuch“ und Einfluß der Schüttel-Geschwindigkeit  
(Fig. 2, S. 549).

VIII: 0.1426 g  $MH_2$  + 20 ccm Eisessig + 20 ccm  $H_2O$  + 10 ccm mol/10000-Cu(II)-Acetat in  $n/1000$ -Essigsäure; b = 746 mm; Schg. = 240/Min.

IX: Genau die gleichen Bedingungen wie in VIII, nur Schg. = 190/Min. Resultate von VIII u. IX in Tabelle 2.

Tabelle 2.

Versuchs-Dauer in Min. ....	5	10	15	20	25	30	40	50	60	70	80	90	100
$O_2$ -Aufnahme in ccm VIII	1.7	3.3	4.7	5.8	6.9	7.7	8.9	9.6	9.8	10.0	10.1	—	—
(0°, 760 mm) IX	1.7	3.3	4.6	5.8	6.9	7.7	8.9	9.6	9.9	10	10.1	10.1	10.2

Oxydation von Leuko-methylenblau in Luft (Fig. 2).

X: 0.1426 g  $MH_2$  + 20 ccm Eisessig + 20 ccm  $H_2O$  + 10 ccm mol/10000-Cu(II)-Acetat in  $n/10000$ -Essigsäure; b = 744 mm; Schg. = 210/Min.

Versuchs-Dauer in Min. ....	5	10	15	20	25	35	50	60	70	80	90	120	150	180	200
$O_2$ -Aufnahme in ccm (0°, 760 mm).....	0.8	1.5	2.0	2.5	3.0	3.8	4.8	5.4	5.9	6.3	6.9	7.9	8.4	8.7	8.8

Wirkung von Ferrosalz-Zusatz auf die Sauerstoff-Absorption im  
„Normalversuch“.

XI: 0.1426 g  $MH_2$  + 20 ccm Eisessig + 10 ccm  $H_2O$  + 10 ccm mol/1000-Mohrsche Salzlösung in  $n/100$ -Essigsäure + 10 ccm mol/10000-Cu(II)-Acetat in  $n/1000$ -Essigsäure; b = 746 mm; Schg. = 220/Min.

XII: XI wurde unter gleichen Bedingungen wiederholt. Ergebnisse in Tabelle 3.

Tabelle 3.

Versuchs-Dauer in Min. ....	5	10	15	20	25	30	40	50	60	70	90	100	110	120
$O_2$ -Aufnahme in ccm XI	2.2	4.1	5.4	6.4	7.2	7.7	8.3	8.5	8.6	8.7	—	8.7	8.7	—
(0°, 760 mm) XII	2.2	3.9	5.3	6.3	7.1	7.6	8.2	8.4	8.5	—	8.7	—	—	8.7

Cystein-Chlorhydrat als Anti-katalysator der Oxydation von  $MH_2$   
durch  $O_2$  (Fig. 3, S. 551).

XIII: 10 ccm mol/100-Cystein-Chlorhydrat in  $n/10$ -Essigsäure + 0.1426 g  $MH_2$  + 20 ccm Eisessig + 10 ccm  $H_2O$  + 10 ccm mol/10000-Cu(II)-Acetat in  $n/1000$ -Essigsäure; b = 755 mm; Schg. = 210/Min.

XIV: 10 ccm mol/1000-Cystein-Chlorhydrat in  $n/100$ -Essigsäure + 0.1426 g  $MH_2$  + 20 ccm Eisessig + 10 ccm  $H_2O$  + 10 ccm mol/10000-Cu(II)-Acetat in  $n/1000$ -Essigsäure; b = 755 mm; Schg. = 200/Min.

XV: 5 ccm mol/1000-Cystein-Chlorhydrat in  $n/100$ -Essigsäure + 0.1426 g  $MH_2$  + 20 ccm Eisessig + 15 ccm  $H_2O$  + 10 ccm mol/10000-Cu(II)-Acetat in  $n/1000$ -Essigsäure; b = 759; Schg. = 200/Min.

XVI: 0.1426 g  $\text{MH}_2$  + 20 ccm Eisessig + 20 ccm mol/10 000-Cystein-Chlorhydrat in  $n/1000$ -Essigsäure + 10 ccm mol/10 000-Cu(II)-Acetat in  $n/1000$ -Essigsäure; b = 758 mm; Schg. = 200/Min.

XVII: 10 ccm mol/10 000-Cystein-Chlorhydrat in  $n/1000$ -Essigsäure + 0.1426 g  $\text{MH}_2$  + 20 ccm Eisessig + 10 ccm Eisessig (aus Versehen statt  $\text{H}_2\text{O}$ !) + 10 ccm mol/10 000-Cu(II)-Acetat in  $n/1000$ -Essigsäure; b = 758; Schg. = 200/Min.

Die Ergebnisse der Versuche XIII—XVII sind in Fig. 3 enthalten.

### Glutathion als Anti-katalysator der Oxydation von $\text{MH}_2$ durch $\text{O}_2$ (Fig. 5, S. 552).

Die Versuche XVIII mit XXI sind mit einem frisch dargestellten Präparat ausgeführt.

XVIII: 10 ccm mol/100-Glutathion in  $n/10$ -Essigsäure + 0.1426 g  $\text{MH}_2$  + 20 ccm Eisessig + 10 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  + 10 ccm mol/10 000-Cu(II)-Acetat in  $n/1000$ -Essigsäure; b = 746 mm; Schg. = 240/Min.

XIX: 5 ccm mol/100-Glutathion in  $n/10$ -Essigsäure + 0.1426 g  $\text{MH}_2$  + 20 ccm Eisessig + 15 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  + 10 ccm mol/10 000-Cu(II)-Acetat in  $n/1000$ -Essigsäure; b = 746 mm; Schg. = 210/Min.

Versuchs-Dauer in Min. . . . .	20	30	40	50	60	80
$\text{O}_2$ -Aufnahme in ccm . . . . .	0.05	0.1	0.2	0.25	0.4	0.5
	(0°, 760 mm)					

XX: 10 ccm mol/1000-Glutathion in  $n/100$ -Essigsäure + 0.1426 g  $\text{MH}_2$  + 20 ccm Eisessig + 10 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  + 10 ccm mol/10 000-Cu(II)-Acetat in  $n/1000$ -Essigsäure; b = 741 mm; Schg. = 220/Min.

XXI: 0.1426 g  $\text{MH}_2$  + 20 ccm Eisessig + 20 ccm mol/10 000-Glutathion in  $n/1000$ -Essigsäure + 10 ccm mol/10 000-Cu(II)-Acetat in  $n/1000$ -Essigsäure; b = 741 mm; Schg. = 220/Min.

Die Resultate der Versuche XVIII, XX u. XXI finden sich in Fig. 5.

Bei den folgenden Versuchen XXII mit XXV wurde ein vor 6 Monaten hergestelltes Glutathion-Präparat verwendet, das teilweise zum Disulfid oxydiert war.

XXII: Zusammensetzung der Reaktions-Lösung genau wie bei XVIII; b = 755 mm; Schg. = 200/Min.

XXIII: Zusammensetzung der Reaktions-Lösung wie bei XIX; b = 755 mm; Schg. = 200/Min.

XXIV: Zusammensetzung der Reaktions-Lösung genau wie bei XX; b = 754 mm; Schg. = 200/Min.

XXV: Zusammensetzung der Reaktions-Lösung wie bei XXI; b = 754 mm; Schg. = 200/Min. (nicht ganz regelmäßig!)

Das Ergebnis des Versuches XXIV findet sich in Fig. 5, während die Resultate der Versuche XXII, XXIII und XXV in der Tabelle 4 verzeichnet sind.

Tabelle 4.

Versuchs-Dauer in Min. . . . .	5	10	15	20	25	30	40	50	60	70	80	90	120
$\text{O}_2$ -Aufnahme	XXII	—	—	—	0.1	—	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	—	0.8
in ccm	XXIII	—	0.1	—	0.2	—	0.3	0.4	0.6	0.7	0.8	1.0	—
(0°, 760 mm)	XXV	1.4	2.8	4.2	5.4	6.5	7.5	9.1	10	10.4	10.6	—	—

Cystein als Anti-katalysator der Oxydation von  $\text{MH}_2$  mit  $\text{O}_2$   
(Fig. 4, S. 552).

Da freies Cystein wegen seiner leichten Oxydierbarkeit schwierig zu handhaben ist, wurden die Cystein-Lösungen so hergestellt, daß man Cystein-Chlorhydrat in Na-Acetat-Lösung löste, wobei also die  $\text{HCl}$  abgestumpft wurde.

XXVI: 10 ccm  $\text{mol}/_{1000}$ -Cystein-Chlorhydrat in  $\text{mol}/_{300}$ -Na-Acetat + 0.1426 g  $\text{MH}_2$  + 20 ccm Eisessig + 10 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  + 10 ccm  $\text{mol}/_{10000}$ -Cu(II)-Acetat in  $n/_{1000}$ -Essigsäure;  $b = 746$  mm; Schg. = 230/Min.

XXVII: 5 ccm  $\text{mol}/_{1000}$ -Cystein-Chlorhydrat in  $\text{mol}/_{300}$ -Na-Acetat + 0.1426 g  $\text{MH}_2$  + 20 ccm Eisessig + 15 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  + 10 ccm  $\text{mol}/_{10000}$ -Cu(II)-Acetat in  $n/_{1000}$ -Essigsäure;  $b = 746$  mm; Schg. = 230/Min.

XXVIII: 0.1426 g  $\text{MH}_2$  + 20 ccm Eisessig + 20 ccm  $\text{mol}/_{10000}$ -Cystein-Chlorhydrat in  $n/_{3000}$ -Na-Acetat + 10 ccm  $\text{mol}/_{10000}$ -Cu(II)-Acetat in  $n/_{1000}$ -Essigsäure;  $b = 746$  mm; Schg. = 210/Min.

XXIX: 10 ccm  $\text{mol}/_{10000}$ -Cystein-Chlorhydrat in  $\text{mol}/_{3000}$ -Na-Acetat + 0.1426 g  $\text{MH}_2$  + 20 ccm Eisessig + 10 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  + 10 ccm  $\text{mol}/_{10000}$ -Cu(II)-Acetat in  $n/_{1000}$ -Essigsäure;  $b = 750$  mm; Schg. = 240/Min.

Fig. 4 enthält die Resultate der Versuche XXVI mit XXIX.

Oxydation von  $\text{MH}_2$  mit  $\text{O}_2$  unter Cystin-Zusatz (Fig. 6, S. 554).

Wegen der Schwerlöslichkeit von Cystin in verd. Essigsäure sollte zunächst das salzsaure Salz verwendet werden. Als man die entsprechende Menge von Cystin-Chlorhydrat mit der zur Herstellung einer  $\text{mol}/_{100}$ -Lösung nötigen  $n/_{10}$ -Essigsäure zusammenbrachte, trat zunächst auch völlige Lösung ein, aber nach wenigen Minuten fiel freies Cystin aus. Das Salz wird vollständig hydrolytisch gespalten. Man setzte nun so lange  $n\text{-HCl}$  zu, bis das Cystin wieder in Lösung ging. Die so hergestellte Cystin-Lösung wurde zu den Oxydations-Versuchen verwendet.

XXX: 10 ccm ca.  $\text{mol}/_{100}$ -Cystin-Lösung + 0.1426 g  $\text{MH}_2$  + 20 ccm Eisessig + 10 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  + 10 ccm  $\text{mol}/_{10000}$ -Cu(II)-Acetat in  $n/_{1000}$ -Essigsäure;  $b = 742$  mm; Schg. = 230/Min.

XXXI: 10 ccm ca.  $\text{mol}/_{1000}$ -Cystin + 0.1426 g  $\text{MH}_2$  + 20 ccm Eisessig + 10 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  + 10 ccm  $\text{mol}/_{10000}$ -Cu(II)-Acetat in  $n/_{1000}$ -Essigsäure;  $b = 742$  mm; Schg. = 230/Min.

Fig. 6 enthält die für die Versuche XXX u. XXXI beobachteten  $\text{O}_2$ -Aufnahmen.

Hemmung der Oxydation von  $\text{MH}_2$  durch  $\text{O}_2$  mit Blausäure (Fig. 6).

XXXII: 10 ccm  $\text{mol}/_{100}$ -KCN in  $\text{H}_2\text{O}$  + 0.1426 g  $\text{MH}_2$  + 20 ccm Eisessig + 10 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  + 10 ccm  $\text{mol}/_{10000}$ -Cu(II)-Acetat in  $n/_{1000}$ -Essigsäure;  $b = 741$  mm; Schg. = 220/Min.

XXXIII: 10 ccm  $\text{mol}/_{1000}$ -KCN in  $\text{H}_2\text{O}$  + 0.1426 g  $\text{MH}_2$  + 20 ccm Eisessig + 10 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  + 10 ccm  $\text{mol}/_{10000}$ -Cu(II)-Acetat in  $n/_{1000}$ -Essigsäure;  $b = 741$  mm; Schg. = 210/Min.

Fig. 6 enthält die Resultate von XXXII u. XXXIII.