

115. Kurt G. Stern: Über den Zusammenhang zwischen Leber-Lyochrom und Katalase (Vorläuf. Mitteil.).

[Aus d. Chem. Laborat. d. Strahlen-Instituts am Virchow-Krankenhaus, Berlin.]
(Eingegangen am 10. März 1933.)

In kurzen Berichten über einige optische Eigenschaften weitgehend gereinigter Katalase-Präparate aus pflanzlichem und tierischem Ausgangsmaterial¹⁾ wurde ein gelbroter Farbstoff mit starker, grüner Fluoreszenz beschrieben. Seine Eigenschaften wurden eingehender am Beispiel von Enzym-Präparaten untersucht, die aus Pferde-Leber bereitet waren. Der neue Farbstoff konnte durch das Spektrum der emittierten Fluoreszenz (breite Emissionsbande im Grün zwischen 538 und 562 $\mu\mu$), weiter durch sein Verhalten gegen eine Reihe chemischer und physikalischer Faktoren, sowie durch seine Elektrophorese (iso-elektrische Zone um p_H 5.7) näher gekennzeichnet werden. Aus der Übereinstimmung einiger Eigenschaften dieses Körpers mit der enzymatischen Komponente der Präparate wurde die Vermutung hergeleitet, daß hier ein ursächlicher Zusammenhang bestehe, derart, daß „Träger der Fluoreszenz in den Katalase-Lösungen Proteine sind, unter denen sich u. a. das Träger-Protein der Katalase befindet“. Während die vorstehenden Beobachtungen, soweit wir sehen können, erstmalig auf das Vorkommen eines wasser-löslichen, gelben Farbstoffes mit grüner Fluoreszenz in der Leber (und auch in Extrakten aus Kürbis-Kotyledonen) aufmerksam machten, sind ähnliche Körper aus der Molke von B. Bleyer und O. Kallmann²⁾, aus Unterhefe von O. Warburg und W. Christian³⁾, sowie aus Herzmuskel von I. Banga und A. Szent-Györgyi⁴⁾ erhalten worden. Kürzlich haben Ph. Ellinger und W. Koschara⁵⁾, sowie gleichzeitig R. Kuhn, P. György und Th. Wagner-Jauregg⁶⁾ hier auf die weite Verbreitung derartiger Körper hingewiesen, Wege zu ihrer Isolierung gezeigt und eine Reihe wertvoller Angaben über chemische und physikochemische Eigenschaften dieser neuen Klasse von Naturfarbstoffen gemacht.

Bei dem Versuch, aus weitgehend gereinigten, hochaktiven Leber-Katalase-Lösungen durch Dialyse, schonende Konzentrierung und Entfernung begleitender Proteine zu einheitlichen Enzym-Fractionen zu gelangen, wurden geringe Substanzmengen erhalten, die unter dem Mikroskop, neben Eiweiß- und Salzkristallen, gefärbte, mehr oder weniger gut definierte Einzelkristalle erkennen ließen. Bei der mikroskopischen Lumineszenz-Analyse zeigte es sich, daß die größeren und besser ausgebildeten dieser Kristalle, die im gewöhnlichen Licht rubinrot waren, im durchfallenden oder auffallenden, gefilterten Ultraviolett kaum merklich fluorescierten, was auf Zugehörigkeit zur Hämoglobin-Gruppe schließen läßt. Die weniger gut definierten, bröckeligen, teilweise bräunlichgelb gefärbten Kristalle hingegen, sowie die kleineren Eiweiß-Teilchen fluorescierten stark grün, teilweise bläulichgrün⁷⁾. Es konnte jedoch nicht entschieden werden, ob es

¹⁾ K. G. Stern, Mitteil. auf d. XIV. Internat. Physiologen-Kongreß, Rom, 29. August 1932; vergl. Kongreß-Berichte in Arch. Scienze biol. **1932**; Ztschr. physiol. Chem. **212**, 207 [1932]. ²⁾ Biochem. Ztschr. **155**, 54 [1925].

³⁾ Naturwiss. **20**, 688, 980 [1932]; Biochem. Ztschr. **254**, 438 [1932], **257**, 492 [1933].

⁴⁾ ebenda **246**, 203 [1932]. ⁵⁾ B. **66**, 315 [1933]. ⁶⁾ B. **66**, 317 [1933].

⁷⁾ Diese Versuche wurden bereits im September 1932 ausgeführt.

sich hierbei um einheitliche Stoffe oder nur um Adsorbate des fluoreszierenden Körpers an Begleitstoffe (Proteine) handelte.

Nach dem Erscheinen der genannten, vorläufigen Mitteilungen von Ellinger bzw. Kuhn und Mitarbeitern über die neue Farbstoff-Klasse haben wir Versuche darüber angestellt, ob die nach den Angaben dieser Forscher dargestellten Farbstoff-Fractionen katalatisch wirksam sind, und ferner ob es möglich ist, den fluoreszierenden Körper der Katalase-Lösungen von der enzymatisch wirksamen Komponente abzutrennen. Als Ausgangsmaterial wurde ausschließlich Pferde-Leber benutzt, da dieses Material sich bereits früher für die Gewinnung enzym- und farbstoff-reicher Lösungen als geeignet erwiesen hatte. In einer Versuchsreihe (vergl. den Versuchs-Teil) wurde ein wäßriger Pferdeleber-Auszug bereitet und aus einer Hälfte nach einem modifizierten, aus den Angaben von Ellinger und von Kuhn und Mitarbeitern kombinierten Verfahren die Lyochrom-(= Flavin-)Fraktion dargestellt. Aus der anderen Hälfte wurde nach der von Warburg und Christian für Hefe ausgearbeiteten Vorschrift eine gelbe Farbstoff-Fraktion erhalten, die sicher auf der einen Seite mit den Lyochromen, auf der anderen Seite mit dem gelben Farbstoff des „zweiten sauerstoff-übertragenden Fermentes“ (Warburg und Christian), sowie mit dem „Cytoflav“ des Herzmuskels (Banga und Szent-Györgyi) in engster Beziehung steht. Hierfür spricht ihre Farbe, Fluorescenz, Löslichkeit, ihre Eigenschaft als reversibles Reduktions-Oxydations-System und ihr amphoterer Charakter. Allerdings konnten wir bei den geringen verfügbaren Konzentrationen bisher nur eine nach Blau zunehmende Absorption, nicht die von Warburg und Christian beobachteten definierten Absorptionsbanden feststellen. Die enzymatische Aktivitäts-Prüfung beider Farbstoff-Fractionen ergab, daß sie weder für sich allein katalatisch aktiv sind, noch imstande sind, Leber-Katalase zu aktivieren. Die spektrale Zerlegung des von beiden Fractionen emittierten Fluoreszenzlichtes bei Einstrahlung gefilterten Ultraviolettes (300–400 $\mu\mu$) ließ sehr breite Emissionsgebiete — von 634–482.5 bzw. 604–510 $\mu\mu$ — erkennen, deren Maximum einheitlich bei etwa 524 $\mu\mu$ zu liegen schien, ohne daß feinere Banden abgrenzbar waren.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde ein wäßriger, mit Alkohol vorgereinigter Leber-Extrakt einerseits mittels Fullererde-Adsorption und Pyridin-Alkohol-Wasser-Elution auf Lyochrome und andererseits mittels Alkohol-Chloroform-Behandlung, Tricalciumphosphat-Adsorption und Phosphat-Elution auf Katalase verarbeitet. In sämtlichen Fractionen wurde sowohl der Katalase-Gehalt (quantitativ) wie der Lyochrom-Gehalt (qualitativ) bestimmt. Dabei zeigte es sich, daß Fullererde nicht nur für Lyochrom, sondern auch für Katalase ein ausgezeichnetes Adsorbens darstellt. Pyridin-Alkohol-Wasser hingegen scheint für Lyochrom ein besseres Eluens zu sein als für Katalase. Durch wiederholte Tricalciumphosphat-Adsorption konnte aus dem zweiten Extrakteil das Enzym fast quantitativ entfernt und mittels sekundären Phosphats in der bekannten ausgezeichneten Ausbeute freigelegt werden. Hier blieb das Lyochrom zum Teil in der Adsorptions-Restlösung, zum größten Teil ließ es sich ebenfalls an das Calciumphosphat binden und mittels sekundären Phosphats eluieren. Lyochrom und Katalase zeigen demnach im Adsorptions- und Elutions-Verhalten starke Ähnlichkeit. Dies erklärt, weshalb in der Regel stark enzym-haltige Leber-Fractionen auch viel Lyochrom enthalten.

Eine annähernde Trennung der beiden Körper konnte ferner in einem Versuche mit einem älteren, gereinigten Leber-Katalase-Präparat erreicht werden: Wurde diese Lösung mit einem Überschuß von Fullererde adsorbiert, so resultierte eine enzymatisch fast unwirksame ($k = 1.2$), hellblau fluoreszierende Adsorptions-Restlösung. Die Elution des Adsorbats mit Pyridin-Alkohol-Wasser lieferte ein grün fluoreszierendes, gelbes Eluat von kaum nennenswerter katalatischer Wirksamkeit ($k = 0.31$). Für diesen Effekt war vielleicht maßgebend, daß nur sehr kurze Zeit (15 Min.) eluiert wurde. Ist es demnach bisher nicht möglich gewesen, lyochrom-freie Katalase-Lösungen zu erhalten, so konnten doch katalase-freie Lyochrom-Lösungen gewonnen werden. Aus dem Gesagten ergibt sich, daß Lyochrom und Katalase der Leber voneinander verschiedene Substanzen darstellen.

Beschreibung der Versuche.

1) 1 kg schlacht-frische, durch die Fleischmaschine getriebene Pferde-Leber etwa 2 Stdn. bei Raum-Temperatur unter mechanischem Rühren mit 1 l Leitungswasser digeriert. Den nach Auspressen durch Mull erhaltenen, stark trüben Extrakt (ca. 1 l) in zwei gleiche Teile geteilt.

Verarbeitung der ersten Hälfte auf Lyochrom (im wesentlichen nach den Angaben von Ellinger bzw. Kuhn und Mitarbeitern): 500 ccm eisgekühlten Leber-Extrakt mit 250 ccm gekühltem absol. Alkohol versetzt und nach kurzem Stehen von der starken Eiweiß-Fällung abzentrifugiert. Rote, sich rasch trübende Flüssigkeit mit 750 ccm einer 50 g Fullererde enthaltenden Suspension innig vermischt, über Nacht im Eisschrank belassen. Sodann Adsorbat von der rötlichen Restlösung (katalatische Aktivität $k = 520.8$) auf der Zentrifuge getrennt. Das aus einer sandigen und einer rötlichen, lockeren Schicht bestehende Adsorbat 2-mal auf der Zentrifuge mit Aq. dest. gewaschen und etwa 1½ Stdn. im Kühlschrank mit einem Gemisch aus 50 ccm Pyridin + 50 ccm absol. Alkohol + 200 ccm Aq. dest. eluiert. Nach Durchsaugen durch einfaches Filter eine ziemlich klare, gelbe, stark grün fluoreszierende Lösung erhalten. Im Vakuum von ca. 20 mm Hg bei maximal 39° das Lösungsmittel verdunstet, den gelbgrünen Rückstand mit 20 ccm Aq. dest. aufgenommen. Nach Filtration gelbe Lösung 2-mal mit je 5 ccm Äther ausgeschüttelt und die wäßrige Schicht wiederum im Vakuum eingedampft. Rückstand mit ein wenig Eisessig ausgezogen, die gelbe, leicht getrübe Lösung mit etwas Aceton versetzt. Von dem flockigen Niederschlag abzentrifugiert, klar gelbe Flüssigkeit im Vakuum auf ca. 3–4 ccm eingengt und unter Zugabe von etwas Methanol im Luft-Thermostaten bei ca. 30° eingetrocknet. Mit etwas Wasser aufgenommen, vom bräunlichen (zum größten Teil in Eisessig löslichen) Rest abfiltriert und bei 35° bis auf etwa 1 ccm eingengt. Diese wäßrige, dunkelgelbe, stark grün fluoreszierende Lösung zu folgendem Versuch benutzt. Das Verhalten gegen Natriumhydrosulfid und gegen Bromwasser war das von Kuhn angegebene. Prüfung auf katalatische Aktivität:

Spaltansätze: 1) 35 ccm etwa 0.02-n. H_2O_2 + 5 ccm m_{15} -prim.-Kaliumphosphat + 5 ccm m_{15} -sek.-Natriumphosphat + 4 ccm Aq. dest. + 0.25 ccm der Farbstoff-Lösung (p_H im Ansatz ca. 6.9). 2) An Stelle des Farbstoffs 1 ccm 1:500 verd. Pferde-leber-Katalase-Lösung V, im Ansatz. 3) 1 ccm der gleichen Katalase-Lösung + 0.25 ccm Farbstoff-Lösung im Ansatz.

Analyse: Den eisgekühlten Ansätzen zu Versuchs-Beginn und sodann nach Intervallen von je 5 Min. je 5 ccm entnommen und sogleich in Vorlagen überführt, die 10 ccm 1-proz. Kaliumjodid-Lösung + 3 ccm 33-proz. Schwefelsäure enthielten. Zur Beschleunigung der Jodabscheidung 3 Tropfen einer wäßrigen Molybdänsäure-Lösung zugefügt. Nach etwa 20 Min. mit 0.02-n. Thiosulfat-Lösung titriert.

Ergebnis:

Im Ansatz	0	5	10	15 Min.	
Lyochrom allein	4.52	4.47	4.48	4.50 ccm	Thiosulfat
Katalase allein	4.43	4.17	3.94	3.66	„ „
Katalase + Lyochrom	4.51	4.16	3.99	3.83	„ „

Demnach besitzt die Lyochrom-Fraktion weder für sich allein katalatische Aktivität, noch vermag sie Leber-Katalase zu aktivieren.

Verarbeitung der zweiten Leberextrakt-Hälfte nach Warburg: 500 ccm Leber-Extrakt mit 200 ccm Bleiacetat (Plumbum subacet. D. A. B. VI) und etwas Octylalkohol etwa 10 Min. geschüttelt. Über Nacht im Eisschrank belassen. Sodann das trübe Gemisch scharf zentrifugiert, jedoch nur unvollständige Abtrennung des Niederschlages erzielt. Trübe Restlösung mit insgesamt 200 ccm $m/2$ -Phosphat-Puffer (20 Vol.-Tle. *prim.*- und 80 Vol.-Tle. *sek.-m/2*-Phosphat, p_H ca. 7.5) versetzt, wodurch das überschüssige Blei quantitativ ausgefällt wurde. Die überstehende rötliche, hellgrün fluoreszierende Flüssigkeit wurde auf der Zentrifuge abgetrennt. Katalatische Aktivität $k = 0.09$. Das Enzym ist demnach quantitativ an die Niederschläge adsorbiert worden. Lösung im Vakuum (15—20 mm Hg) bei maximal 40° auf 125 ccm eingengt und vom entstandenen Niederschlag abzentrifugiert. 60 ccm Aceton zugefügt und über Nacht bei etwa -5° aufbewahrt. Sodann von dem rötlichen Niederschlag (hämochromogen-haltig) und von ausgeschiedenen Krystallmassen (Phosphat) abfiltriert. Da beim Einleiten von CO_2 unter Eiskühlung entgegen der Vorschrift von Warburg und Christian kein Niederschlag entsteht, im Vakuum auf 30 ccm eingengt, 15 ccm Aceton zugefügt und unter Kühlung wiederum CO_2 eingeleitet. Nach 12 Stdn. im Eisschrank ist ein voluminöser Niederschlag und eine gelbe Restlösung vorhanden. Durch Wiederholung der Aceton-Behandlung, Einengen im Vakuum und wiederholte analoge Behandlung mit Methanol in der Kälte, sowie neuerliche Konzentrierung unter vermindertem Druck schließlich rötlichgelbe, ölige Flüssigkeit (9 ccm) erhalten, die nach der Sulfo-salicylsäure-Probe eiweißfrei ist. Bei Einstrahlung gefilterten Ultravioletts stark grüne Fluoreszenz. Die visuelle Beobachtung derselben mit einem Autokollimations-Spektroskop (Fuess) zeigt eine breite Emission von etwa $634-482.5 \mu\mu$ mit einem Intensitätsmaximum bei etwa $524 \mu\mu$. Das Absorptionsspektrum läßt in den verfügbaren geringen Schichtdicken keine abgrenzbaren Banden, sondern nur eine nach Blau hin zunehmende Endabsorption erkennen.

Prüfung auf katalatische Aktivität: Bei sonst gleicher Anordnung wie oben beschrieben für die Farbstoff enthaltenden Spaltausätze je 1 ccm der Endfraktion angewandt.

Ergebnis:

Im Ansatz	0	5	10	15	60 Min.
Farbstoff allein	3.96	3.96	3.96	3.96	3.94 ccm
Katalase allein	4.09	3.78	3.53	3.45	Thiosulfat
Katalase + Farbstoff	3.88	3.70	3.59	3.49	„

Demnach besitzt auch diese Fraktion weder katalatische Wirksamkeit, noch ist ein Effekt auf Leber-Katalase nachweisbar.

2) Pferdeleber-Fraktionierung auf Katalase und Lyochrome: 500 g zu Brei zerkleinerte, frische Pferde-Leber etwa 1 Stde. bei Raum-Temperatur mit 600 ccm Aq. dest. digeriert, sodann durch Mull gepreßt. Katalatische Aktivität $k = 842.7$. Gekühlt, Eiweißkörper durch Zusatz von 300 ccm 95-proz. (mit Methanol vergällten) Alkohols teilweise gefällt, nach 30 Min. zentrifugiert. Katalatische Aktivität der 560 ccm betragenden Restlösung: $k = 991$. Eine derartige Aktivierung von Leber-Extrakten durch Alkohol-Behandlung (Wegschaffung von Antikatalase?) ist bereits von anderen Autoren beschrieben worden. Dieser vorgereinigte Auszug wurde in 2 Tle. von je 280 ccm geteilt: Die eine Hälfte wurde mit 350 ccm einer 25 g Fullererde enthaltenden Suspension

vermischt und 2 Tage im Kühlschranks belassen. Die katalatische Aktivität der überstehenden, addekantierten, roten Flüssigkeit betrug $k = 452.5$. Das 2-mal mit Aq. dest. gewaschene Fullererde-Adsorbat wurde 2 Stdn. mit 150 ccm des bereits oben angewandten Pyridin-Alkohol-Wasser-Gemisches eluiert. Das trübe, rötliche Eluat wies stark grüne Fluoreszenz und eine katalatische Wirksamkeit von $k = 256.2$ auf.

Die andere Hälfte des mit Alkohol vorgereinigten Auszuges wurde teilweise mit einer Mischung aus 150 ccm denaturiert. Alkohol + 150 ccm Chloroform geschüttelt und von dem dicken Eiweiß-Niederschlag abzentrifugiert. Die katalatische Aktivität der grünlichen Lösung betrug $k = 836.7$. Der größte Teil des Enzyms war also in der Lösung verblieben. Bei Adsorption mit 15 g Tricalciumphosphat hinterblieb eine Restlösung vom $k = 546.5$. Durch nochmalige Adsorption der Restlösung mit 10 g Tricalciumphosphat konnte der größte Teil des Enzyms gebunden werden (k der Restlösung 65.25). Die gelbe Farbe und grüne Fluoreszenz der letzten Restlösung zeigte jedoch, daß das Lyochrom zum Teil zurückgeblieben war. Die vereinigten Calciumphosphat-Adsorbate wurden 2 Tage im Eisschranks mit 100 ccm 1-proz. sek. Natriumphosphat-Lösung eluiert. Das abzentrifugierte Eluat war bräunlich-olivgrün, besaß starke grüne Fluoreszenz und die relativ hohe katalatische Aktivität von $k = 1395$. Das direkte Absorptionsspektrum zeigte eine Bande bei $630 \mu\mu$ mit einem Nachschatten bei $600 \mu\mu$, sowie eine schwächere Bande bei $550 \mu\mu$. Die Fluoreszenz zeigte im Spektroskop eine breite Emission zwischen 604 und $510 \mu\mu$ mit einem Maximum bei $524 \mu\mu$. Daß im Adsorbat noch Lyochrome zurückgeblieben waren, wurde durch Nach-elution mit 50 ccm des Pyridin-Alkohol-Wasser-Gemisches bewiesen, die nach 2 Stdn. in der Kälte ein leicht trübes, gelbliches Eluat mit nicht sehr starker grüner Fluoreszenz lieferte.

Bei der Durchführung der Versuche wurde ich in dankenswerter Weise von meiner Frau, sowie von Frl. I. Wohlfeil unterstützt.

116. Arnold Weissberger: Zur Frage der Existenz optisch aktiver Diazoverbindungen, III. Mitteil. ¹⁾.

[Aus d. Chem. Laborat. d. Universität Leipzig.]

(Eingegangen am 10. März 1933.)

Seit gezeigt wurde^{1), 2)}, daß die dem Diazo-bernsteinsäure-ester zugeschriebene³⁾ optische Aktivität von seiner Verunreinigung mit Äpfelsäure-ester herrührt, haben W. A. Noyes und E. Meitzner^{4), 5)} erneut zur Frage der Existenz optisch aktiver⁶⁾ Diazoverbindungen Stellung genommen. Auf das von ihnen angeführte „ β -Naphthol-phenyl-diazomethan“⁴⁾ von F. E. Ray⁷⁾ braucht nicht mehr eingegangen zu werden, da dieser Autor inzwischen erkannt hat, daß die Substanz keine Diazoverbindung ist⁸⁾. Auch der Befund, daß in den Amino-camphern

¹⁾ II. Mitteil.: A. Weissberger u. H. Bach, B. **65**, 265 [1932].

²⁾ A. Weissberger u. R. Haase, B. **64**, 2896 [1931].

³⁾ P. A. Levene u. L. A. Mikeska, Journ. biol. Chem. **45**, 593 [1920], **52**, 485 [1922], **55**, 795 [1923]; H. M. Chiles u. W. A. Noyes, Journ. Amer. chem. Soc. **44**, 1798 [1922]; H. Lindemann, A. Wolter u. R. Groger, B. **63**, 702 [1930].

⁴⁾ Chim. et Ind. **27**, Sond.-Nr. 3, 507 [1932] (C. **1932**, I 3419).

⁵⁾ Journ. Amer. chem. Soc. **54**, 3768 [1932].

⁶⁾ Damit sind wie in den früheren Mitteilungen nur solche Diazoverbindungen gemeint, in denen das mit der Diazogruppe verbundene Kohlenstoffatom Träger der Asymmetrie sein soll. ⁷⁾ Journ. Amer. chem. Soc. **54**, 295 [1932].

⁸⁾ Journ. Amer. chem. Soc. **54**, 4753 [1932].