

Schwächer scheint die Polarität in den Dithio-carbamaten der sekundären Amine ausgeprägt zu sein, da sie nicht nur von der Temperatur weitgehend beeinflußt wird, die das Verhältnis zwischen den beiden magnetisch-isomeren Formen ändert, sondern überdies von den mit dem Stickstoffatom verbundenen Radikalen abhängt, welche sterisch oder auf andere Art die Intensität des Dipoles zu beeinflussen vermögen.

In Abwesenheit eines Dipoles, z. B. im Falle der einfachen Dithio-salze, besteht keinerlei Hindernis für den Eintritt der homöopolaren Valenz-Elektronen in die tiefer gelegenen Quanten-Bahnen (3d), was zur magnetischen Struktur der echten Komplexverbindungen führt.

Unsere Versuche lassen zum ersten Male die Möglichkeit der gleichzeitigen Existenz von magnetisch-isomeren Formen erkennen, die untereinander im Gleichgewicht sind, wobei letzteres einerseits von der Temperatur, andererseits von der mehr oder weniger polaren Natur des Säure-Radikals abhängt. Es wird auf Grund der vorliegenden Ausführungen angenommen, daß ein derartiges Verhalten allgemeiner Natur sei, oder wenigstens auch in anderen Eisenkomplexverbindungen vorliegt, die wir zu untersuchen beabsichtigen.

134. Georg-Maria Schwab, Bruno Rosenfeld und Louis Rudolph: Zur Frage des Ketten-Charakters der Katalase-Wirkung.

[Aus d. Chem. Laborat. d. Bayer. Akademie d. Wissenschaften in München.]

(Eingegangen am 27. März 1933.)

Die Theorie von Haber und Willstätter¹⁾, nach welcher oxydative Ferment-Reaktionen lange Radikal-Ketten darstellen sollen, stößt bekanntlich auf die Schwierigkeit, die ausgesprochene Spezifität der hier wirkenden Enzyme ausreichend zu erklären, besonders wenn man allen derartigen Reaktionen gemeinsame Kettenträger, wie OH, zuschreibt. Es ist daher besonders wichtig, den angenommenen Ketten-Charakter überhaupt oder doch die unspezifische Natur der Ketten-Träger nachzuprüfen.

Die strenge Methode einer derartigen Prüfung ist die von Bäckström, der in bekannten Arbeiten²⁾ Dunkelreaktionen bezüglich ihrer Hemmbarkeit mit der jeweils entsprechenden Lichtreaktion meßbarer Kettenlänge vergleicht. In einer kurzen Mitteilung erklärt D. Richter³⁾, auf diesem Wege auch für die katalatische Hydroperoxyd-Spaltung Hinweise auf ihre Ketten-Natur erhalten zu haben. Es ist wohl weiteres Material abzuwarten, da schon die Ketten-Natur der betreffenden Lichtreaktion nicht befriedigend sichergestellt erscheint (s. Allmand und Style⁴⁾ und andererseits Heidt⁵⁾).

Eine andere Methode besteht darin, den vermuteten Ketten-Träger direkt zu erzeugen und nachzusehen, ob er in dem Substrat-System Ketten

1) F. Haber u. R. Willstätter, B. **64**, 2844 [1931].

2) H. Bäckström, Journ. Amer. chem. Soc. **49**, 1460 [1927]. — H. Alyea u. H. Bäckström, Journ. Amer. chem. Soc. **51**, 90 [1929]. — H. Bäckström u. A. Alyea, Transact. Faraday Soc. **24**, 601 [1928].

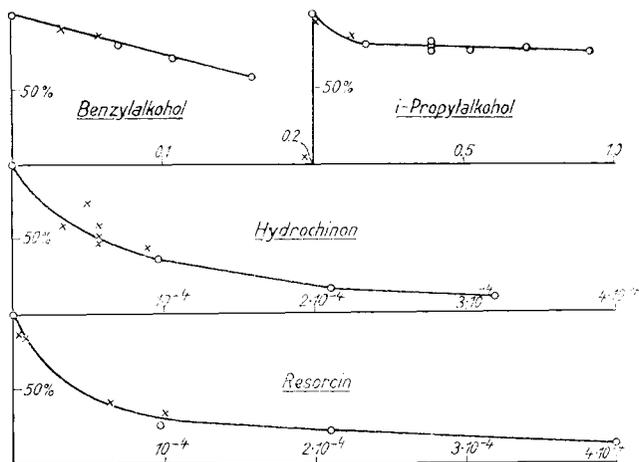
3) D. Richter, Nature **129**, 870 [1932].

4) A. Allmand u. D. Style, Journ. chem. Soc. London **1930**, 596, 606.

5) L. Heidt, Journ. Amer. chem. Soc. **54**, 2844 [1932].

auslöst. So haben H. S. Taylor und Gould⁶⁾ durch photochemisch aus Hydroperoxyd erzeugte OH-Radikale in dem System Acetaldehyd-Sauerstoff sehr kurze Ketten induzieren können.

Eine einfache Möglichkeit, wenigstens die Nicht-spezifität der Ketten-Träger zu untersuchen, ist die Prüfung des Verhaltens als gleichartig angesehenen Reaktionen gegenüber denselben Hemmungskörpern. Bei drei nicht-enzymatischen Reaktionen haben das Jeu und Alyea⁷⁾ neuerdings durchgeführt. Auf ihre Ergebnisse kommen wir zurück. In vorliegender Mitteilung wird diese Methode auf den Vergleich der Wirkung tierischer Katalase mit Autoxydations-Reaktionen angewandt, da bei allen diesen Reaktionen nach der Haber-Willstätterschen Theorie das ketten-fortpflanzende Radikal (OH) identisch sein sollte.



Die Figur gibt das Ergebnis unserer Katalase-Messungen wieder. In den Teilfiguren ist Abszisse jeweils die Molarität des angegebenen Hemmungskörpers, Ordinate die Spaltungs-Geschwindigkeit von Hydroperoxyd in Prozenten der ohne Zusatz des Hemmungskörpers gemessenen. Wegen natürlicher Schwankungen der Enzym-Aktivität liegen die direkt aneinander anschließend gemachten Versuche (o) genauer auf Kurven, als willkürliche Einzelmessungen (x). Neben den quantitativen Unterschieden in der erforderlichen Konzentration des Hemmungskörpers fällt auch qualitativ die Verschiedenheit des Kurven-Habitus bei den beiden Phenolen einerseits, den Alkoholen andererseits ins Auge. Orientierende Versuche mit $\sim 10^{-5}$ -m. Stilben schließen sich letzteren an; Mannit 0.05-m. und Äthylalkohol 0.2-m. hemmen die Katalase nicht.

Beobachtungen der hemmenden Wirkung der gleichen Hemmungskörper auf andere Reaktionen, teils von uns (Benzaldehyd-Autoxydation), größtenteils von anderer Seite, sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

⁶⁾ H. S. Taylor u. A. Gould, Journ. Amer. chem. Soc. **55**, 859 [1933].

⁷⁾ Kia Khwe Jeu u. H. Alyea, Journ. Amer. chem. Soc. **55**, 575 [1933].

Hemmungs- Körper	Katalase Konzentrat. d. 20-proz. Hemmung (diese Arbeit)	Photolyse des H ₂ O ₂ . Hemmungs- Konstante (Jeu und Alyea) (l. c.)	Photo- poly- merisat. d. Vinyl- acetats. Hemmungs- Konstante (Jeu und Alyea)(l.c.)	Aut- oxydat. d. Sulfits (ohne Cu-Zusatz) Hemmungs- Konstante (Jeu und Alyea)(l.c.)	Autoxydat. des Sulfits		Autoxydat. des Benzaldehyds	
					Hemmungs- Konstante (Bäckström und Mitarbeiter, l. c.)	Konzentrat. d. 50-proz. Hemmung	Konzentrat. d. 50-proz. Hemmung (diese Arbeit)	Hemmungs- Konstante (Raymond) (8)
Äthylalkohol ..	hemmt bis 0.2-m. nicht	130	1.2	0.9	—	extrap.: 0.008	hemmt	—
i-Propylalkohol	0.2	—	—	—	3	0.025	—	n-Propyl- alkohol 1190
Benzylalkohol .	0.07	6700	26	34	37	0.0002	—	—
Mannit	hemmt bis 0.05-m. nicht	—	—	—	—	0.002	—	—
Stilben	10 ⁻⁵	—	—	—	—	—	10 ⁻²	145000
Resorcin	10 ⁻⁵	11000	29	30	—	—	6.10 ⁻⁴	—
Hydrochinon ..	10 ⁻⁵	8400	1000	9000	>370	<10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	7140000

Setzt man dort, wo nicht Hemmungs-Konstanten einer kinetischen Gleichung, sondern nur Konzentrationen gleicher Hemmung angegeben sind, deren Reziproke als ein ganz ungefähres Maß der Hemmungs-Konstante, und setzt man weiter bei allen Reaktionen die Konstante des Hydrochinons zu 10000, so erhält man:

Hemmungs- körper	Kata- lase	Photolyse d. H ₂ O ₂	Vinyl- acetat	Autoxydat. d. Sulfits		Benz- aldehyd	
Äthylalkohol ..	< 0.5	155	12	1	—	125	> 0
i-Propylalkohol	0.5	—	—	—	80	40	—
Benzylalkohol .	1.4	7980	260	38	1000	5000	—
Mannit	< 2	—	—	—	—	500	—
Stilben	~ 10000	—	—	—	—	—	100
Resorcin	10000	13100	290	33	—	—	1670
Hydrochinon ..	10000	10000	10000	10000	> 10000	> 10000	10000

Selbstverständlich sind diese Zahlen, ihrer verschiedenen Herkunft und Berechnungsweise, sowie vielfach ihrer eigenen Genauigkeit nach, nur äußerst roh und nicht quantitativ vergleichbar. Vergleicht man aber die Abstufung der hemmenden Wirksamkeit für Katalase mit der für die anderen Reaktionen, so ergibt sich immerhin folgendes Bild: Mit der Photolyse des Hydroperoxyds (Spalte 2) steht die Reihe bei der Katalase (Spalte 1) der Richtung nach in Übereinstimmung. Jedoch ist die Hemmung durch primäre Alkohole, besonders Benzylalkohol, bei der Photolyse größenordnungsmäßig stärker. Gegenüber der Polymerisation des Vinylacetats im Licht (Spalte 3) und der Autoxydation des Sulfits (Spalte 4, weniger genau Spalte 5 und 6), die, wie schon Jeu und Alyea (l. c.) bemerkten, untereinander ungefähr übereinstimmen, fällt Resorcin durch seine starke Hemmung der Katalase heraus. Dasselbe gilt beim Vergleich mit Benzaldehyd (Spalte 6 und 7).

⁸⁾ E. Raymond, Compt. rend. Acad. Sciences **191**, 616 [1930]; Journ. Chim. Phys. **28**, 316, 421, 480 [1931].

Eine Stütze für die Ansicht, daß die Hemmungskörper bei allen betrachteten Reaktionen an einem identischen Ketten-Träger angreifen, kann trotz der Übereinstimmung, die in großen Zügen besteht, angesichts der deutlichen Unterschiede in diesen Versuchen wohl nicht erblickt werden. Auch eine zusätzliche Verdrängungs-Hemmung am Enzym würde die Unterschiede zwischen den nicht-enzymatischen Reaktionen bestehen lassen. So bleibt durchaus noch Raum für die Annahme, daß der Verlauf der Ketten-Reaktion, wofern eine solche vorliegt, spezifisch und durch den Mechanismus ihrer Auslösung bedingt ist. Das ist deshalb wichtig, weil die ausgesprochene Enzym-Spezifität auf diese Weise verständlich bleibt.

Beschreibung der Versuche.

Enzym-Material: Die Katalase wurde aus Pferde-Leber nach den Angaben von K. Zeile und H. Hellström⁹⁾ dargestellt. Es ist zweckmäßig, nur den zweiten Extrakt des Leber-Breis zu verarbeiten, da, wie schon Euler¹⁰⁾ fand, der erste Extrakt störende Eiweißfällungs- und Inaktivierungs-Erscheinungen zeigt. Die Lösung behielt, unter Toluol im Eisschrank aufbewahrt, innerhalb der Versuchsfehler $4\frac{1}{2}$ Monate völlig konstante Aktivität. Olivbraune Lösung mit dem von Zeile (l. c.) angegebenen Spektrum.

Ausgangsstoffe: Hydroperoxyd war Perhydrol Merck p. a., dessen verd. Lösung in gut ausgedämpfter, dunkler Glasflasche monatelang titer-konstant blieb. Mannit und Hydrochinon wurden umkrystallisiert, Resorcin im Vakuum destilliert und umkrystallisiert, Benzaldehyd wurde im Vakuum, *i*-Propylalkohol und Benzylalkohol wurden bei gewöhnl. Druck destilliert, der zuletzt genannte nach Schütteln mit Sulfit. Stilben lag rein vor.

Versuchsgang: Von der auf das 2500-fache verdünnten Enzym-Lösung wurden 2 ccm mit 7.5 ccm $m/_{10}$ -Phosphat ($p_{H} = 6.83$) und 5.5 ccm Wasser versetzt. Dieser Ansatz wurde vermischt mit 35 ccm ca. 0.02-*n*. Hydroperoxyd. Der Hemmungskörper wurde je nach Verhältnissen dem Enzym oder dem Substrat zugesetzt. Mischung und Reaktion fanden bei 0° statt. Nach 2, 3, 6, 9 Min. wurden Proben entnommen und in saurer Lösung in Gegenwart von Molybdänsäure jodometrisch titriert. Die mit dem 2-Min.-Wert als Anfangspunkt integrierte Konstante erster Ordnung, auf dekadische Logarithmen und auf 1 ccm der Enzym-Urlösung bezogen, betrug ungehemmt $10 \pm 1 \text{ Min}^{-1}$. Es sei bemerkt, daß die Konstanten meist einen schwach (5–10%) fallenden Gang aufwiesen, der nur bei starken Hemmungen ausgeprägter wurde. Die Figur ist auf Grund von Mittelwerten gezeichnet.

Die Benzaldehyd-Versuche wurden so vorgenommen, daß Benzaldehyd rein und mit 3 verschiedenen Mengen Hemmungskörper mit Luft gleichzeitig in 4 Schüttelbirnen unter Druckmessung geschüttelt wurde.

Dem Direktor des Laboratoriums, Hrn. Geh.-Rat Prof. Dr. H. Wieland, sowie der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft haben wir für die Ermöglichung der Untersuchung herzlich zu danken.

⁹⁾ K. Zeile u. H. Hellström, Ztschr. physiol. Chem. **192**, 174 [1930], **195**, 43 [1931]; s. a. Tsuchihashi, Biochem. Ztschr. **140**, 63 [1923] und H. v. Euler u. Josephson, A. **452**, 177 [1927].

¹⁰⁾ s. Anm. 9).