

123. Wolfgang Langenbeck, Ludwig Weschky und Otto Gödde: Über organische Katalysatoren, XVI. Mittel.¹⁾: Künstliche Dehydrasen III.²⁾

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

(Eingegangen am 25. Februar 1937.)

Im Jahre 1927 entdeckte der eine von uns (Langenbeck³⁾) den Mechanismus der Dehydrasewirkung, welcher einige Jahre später seit der Auf- findung des gelben Ferments durch Warburg und Christian allgemeiner bekannt geworden ist. Die Katalyse besteht darin, daß der Katalysator zwei Wasserstoffatome des Substrats aufnimmt und dabei selbst in einen besonders leicht dehydrierbaren Zwischenstoff übergeht:

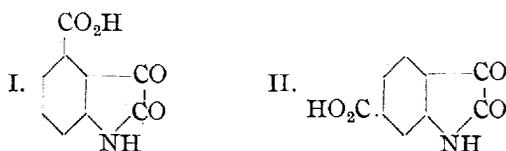


(S.H₂ = Substrat, K = Katalysator, S = dehydriertes Substrat, MB = Metylenblau, MB.H₂ = Leuko-metylenblau).

Als erstes Modellbeispiel diente das Isatin, welches die Dehydrierung der α -Aminosäuren durch Sauerstoff oder Metylenblau katalysiert³⁾.

Wir haben diese Versuche wieder aufgenommen mit dem Ziel, das Isatin nach den bisher bewährten Methoden zu aktivieren. Dabei stießen wir auf Isatin-Derivate, die in Wasser und verdünnter Essigsäure schwer löslich waren. Wir waren daher gezwungen, nach einem neuen Lösungsmittel zu suchen und stellten unter anderem auch Versuche in verdünntem Pyridin bei Gegenwart von etwas Essigsäure an. Zu unserer Überraschung waren die Katalysatoren in diesem Lösungsmittel etwa 100-mal so aktiv, wie in verdünnter Essigsäure. Wir haben deshalb die Messungen stets in Pyridin durchgeführt.

Eine weitere sehr starke Aktivierung des Isatins ließ sich erzielen durch Einführung eines Carboxyls in 4- oder 6-Stellung. Isatin-carbonsäure-(4) (I)⁴⁾ und Isatin-carbonsäure-(6) (II)⁵⁾ waren 20-mal so wirksam wie



Isatin. Durch zwei sehr einfache Maßnahmen, Änderung des Lösungsmittels und Einführung eines Carboxyls, ließ sich also die Aktivität auf den 2000-fachen Wert steigern.

Interessant ist, daß die Isatin-carbonsäuren in Pyridin fast dreimal so wirksam sind, wie das gelbe Ferment (Lactoflavin-phosphorsäure + Trägerprotein). Stellt man in Rechnung, daß das Flavinferment für sich

¹⁾ XV. Mittel. s. die voranstehende Arbeit in diesem Heft der Berichte.

²⁾ I.: W. Langenbeck, B. **60**, 930 [1927]; II.: W. Langenbeck, B. **61**, 942 [1928]; vergl. auch W. Langenbeck, Chem.-Ztg. **60**, 953 [1936].

³⁾ Über den Mechanismus der Reaktion vergl. W. Langenbeck, Die organischen Katalysatoren, S. 43 [Berlin 1935]; W. Langenbeck u. U. Ruge, B. **70**, 367 [1937].

⁴⁾ P. Friedländer u. I. Weisberg, B. **28**, 1642 [1895].

⁵⁾ W. Langenbeck, R. Jüttemann u. F. Hellrung, A. **499**, 208 [1932]; H. Waldmann, Journ. prakt. Chem. [2] **147**, 338 [1937].

völlig unwirksam ist und noch einer Co-Dehydrase und eines Zwischenferments bedarf, so verschiebt sich das Aktivitäts-Verhältnis noch mehr zugunsten der Isatin-carbonsäure. Es ist deshalb wohl berechtigt, unsere Katalysatoren als künstliche Fermente zu bezeichnen⁶⁾. Die Aktivitäten des gelben Ferments, der künstlichen Dehydrase und einer künstlichen Carboxylase sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Tabelle 1. Anzahl Millimole Substrat, die 1 g Katalysator in 1 Min. bei etwa 37° umsetzt.

Katalysator	Millimole Substrat pro Min. und g Katalysator bei etwa 37°
Gelbes Ferment gegen Methylenblau ⁷⁾	1
Isatin-carbonsäure-(6) gegen Methylenblau	2.6
6-Methyl-3-amino- α -naphthoxindol gegen Phenyl-glyoxyl- säure ⁸⁾	1.5

Wir beabsichtigen, die Versuche zur Aktivierung noch weiter fortzusetzen.

Anhangsweise teilen wir katalytische Messungen mit, bei denen Flavine statt Methylenblau als Wasserstoff-Acceptoren dienten. Nur Flavine mit sehr positivem Potential, wie das 9-Phenyl-flavin⁹⁾ und das 6.8.9-Trimethylflavin¹⁰⁾ waren als Acceptoren bei der Isatin-Katalyse brauchbar.

Beschreibung der Versuche.

Meßmethode: Die Meßmethode lehnte sich, was die Apparatur betrifft, z. Tl. an das Verfahren von H. Wieland und B. Rosenfeld¹¹⁾ an. Als Substrat diente *d,l*-Alanin und eine $m/_{100}$ -Lösung von Methylenblau in 10-proz. Essigsäure (0.3737 g Methylenblau medicinale Merck + 10 ccm Eisessig + 2 g Alanin mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt). In ein Reagensglas von etwa 10 ccm Inhalt, das einen seitlichen Rohransatz mit Schliffhahn trug, wurde der Katalysator eingewogen und durch Zusatz von 5 ccm reinem (über Ätzkali destilliertem) Pyridin in Lösung gebracht. Das Röhrchen wurde zum Temperatenausgleich in einen gläsernen Thermostaten von 40° gebracht, ebenso ein Gefäß mit 5 ccm der Substratlösung. Zu Beginn der Reaktion entnahm man der Substratlösung 2 ccm mit der Pipette und ließ sie in die Katalysatorlösung einfließen. Dieser Zeitpunkt wurde notiert. Gleich darauf setzte man mit einem Gummistopfen ein Gaseinleitungsrohr auf das Reaktionsgefäß und ließ aus einem Kippschen Apparat 2 Min. lang einen Strom von reinem gewaschenen Wasserstoff durch die Lösung streichen. Endlich wurde mit Hilfe von zwei Glashähnen am Ein- und Ableitungsrohr das Reaktionsgefäß luftdicht abgeschlossen. Als Endpunkt der Reaktion galt der Farbumschlag von blau nach schwach gelblich.

⁶⁾ Die Lactoflavin-phosphorsäure und ihre synthetischen Analogen sind keine künstlichen Fermente. Ihre Wirkung ist an die Gegenwart ganz spezifischer Apofermente gebunden, deren Konstitution unbekannt ist.

⁷⁾ berechnet nach Angaben von R. Kuhn u. H. Rudy, B. **69**, 1974 [1936].

⁸⁾ vergl. die Arbeit von W. Langenbeck u. O. Gödde in diesem Heft der Berichte.

⁹⁾ R. Kuhn u. F. Weygand, B. **68**, 1282 [1935].

¹⁰⁾ R. Kuhn u. F. Weygand, B. **67**, 1459 [1934].

¹¹⁾ A. **477**, 41 [1929].

Tabelle 2. Entfärbungszeiten mit Isatin-Derivaten bei 40°.

Katalysator	Menge in Molen	Entfärbungszeit in Min.
Ohne Katalysator.....	—	nicht entfärbt
Isatin	10 ⁻⁴	10
Isatin	2.10 ⁻⁵	43
5-Brom-isatin.....	10 ⁻⁴	8.5
5.7-Dibrom-isatin	2.10 ⁻⁵	59
Isatin-carbonsäure-(4) ¹²⁾	2.10 ⁻⁵	2
Isatin-carbonsäure-(4)	5.27.10 ⁻⁶	11
Isatin-carbonsäure-(5) ¹³⁾	2.10 ⁻⁵	30
Isatin-carbonsäure-(6) ¹⁴⁾	2.10 ⁻⁵	2
Isatin-carbonsäure-(6)	1.18.10 ⁻⁶	35
Isatin-carbonsäure-(7) ¹⁵⁾	2.10 ⁻⁵	31
α -Naphthisatin	10 ⁻⁴	17
β -Naphthisatin	10 ⁻⁴	nicht entfärbt
5-Methyl- α -naphthisatin ¹⁶⁾	2.10 ⁻⁵	81
6-Methyl- α -naphthisatin ¹⁶⁾	2.10 ⁻⁵	64
7-Methyl- α -naphthisatin ¹⁶⁾	2.10 ⁻⁵	93
8-Methyl- α -naphthisatin ¹⁶⁾	2.10 ⁻⁵	84
α -Naphthisatin-carbonsäure-(6) ¹⁷⁾	1.13.10 ⁻⁶	12
6.7-Pyridino-isatin-chlorhydrat ¹⁸⁾	2.10 ⁻⁵	52
7.6-Pyridino-isatin ¹⁹⁾	2.10 ⁻⁵	39

Versuche mit Flavinen als Wasserstoff-Acceptoren.

10⁻⁴ Mol. Isatin, 10⁻⁵ Mol. des Flavins und 0.1 g *d,l*-Alanin wurden in 10 ccm 50-proz. Essigsäure im Thermostaten auf 70° erhitzt. Die Fluoreszenz des Flavins verschwand bei keinem Versuch vollständig; colorimetrisch ließ sich aber der Gehalt an Flavin am Schluß der Reaktion annähernd feststellen, da das gelbe Isatin durch Reduktion entfärbt wurde.

Tabelle 3. Flavine als Wasserstoff-Acceptoren.

Flavin	Reaktionsverlauf
9-Methyl-flavin ²⁰⁾	nach 72 Stdn. keine Aufhellung
9-Phenyl-flavin ²⁰⁾	nach 19 Stdn. 93% des Flavins reduziert
6.8.9-Trimethyl-flavin ²⁰⁾	nach 5½ Stdn. 60% Flavin reduziert; nach 23 Stdn. 92%
6.8.9-Trimethyl-flavin (ohne Katalysator) ..	nach 42 Stdn. keine Aufhellung.

¹²⁾ P. Friedländer u. I. Weisberg, B. 28, 1642 [1895].

¹³⁾ H. Waldmann, Journ. prakt. Chem. [2] 147, 338 [1937].

¹⁴⁾ H. Waldmann, a. a. O. ¹⁵⁾ H. Waldmann, a. a. O.

¹⁶⁾ W. Langenbeck u. O. Gödde, die vorangehende Arbeit in diesem Heft.

¹⁷⁾ dargestellt und gemessen von K. Weissenborn, bisher unveröffentlicht.

¹⁸⁾ W. Langenbeck, R. Jüttemann u. F. Hellrung, A. 499, 210 [1932].

¹⁹⁾ W. Langenbeck, R. Jüttemann u. F. Hellrung, A. 499, 211 [1932].

²⁰⁾ R. Kuhn u. F. Weygand, a. a. O.