

Misch-Schmp., Analyse) nachgewiesen wurde. Aus dem angesäuerten, mit Wasserdampf nicht flüchtigen Anteil wurde ein in Natriumcarbonat-Lösung völlig lösliches, braunes, zähes Öl (7 g) gewonnen, das bei der Vakuumdestillation neben viel nicht flüchtigem Harzrückstand 2.5 g Phenylessigsäure gab, die aus Petroläther umkrystallisiert bei 78° schmolz (Misch-Schmelzp.).

$C_8H_8O_2$  (136.1) Ber. C 70.55 H 5.93 Gef. C 70.76 H 5.99.

B) 10 g Agropyren wurden auf die gleiche Art in 40 ccm Chloroform mit Ozon behandelt, wobei noch mehr Harzteile als bei Versuch A entstanden. Die sauren Spaltprodukte wurden in Form der trockenen Natriumsalze mit Amylalkohol überschiehtet und durch Einleiten von trockenem Chlorwasserstoff-Gas in die Amylester übergeführt. Durch Destillation wurde ein Anteil vom Sdp. 138–140° und den Eigenschaften des Essigsäureamylesters ( $d_4^{20}$  0.8725) gewonnen.

## 17. Richard Kuhn und Helmut Beinert: Hemmstoffe der Carboxylase.

[Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]

(Eingegangen bei der Redaktion der Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft am 14. Januar 1945.)

Es wurde der Einfluß verschiedener Stoffe, insbesondere von Benzo-, Naphtho- und Anthrachinonen auf die Aktivität hochgereinigter Hefecarboxylase untersucht. Am wirksamsten waren halogensubstituierte Chinone und Naphthazarine. 2-Brom-naphthazarin hemmte unter den eingehaltenen Bedingungen in einer Verdünnung von 1:2 000 000 zu 50%, „Aufgeschlitzte“ Chinone von der Art des  $\alpha, \beta$ -Diacetyl-äthylens  $H_3C \cdot CO \cdot CH: CH \cdot CO \cdot CH_3$  erwiesen sich gleichfalls als Hemmstoffe. Es waren etwa 7 Moleküle 2-Brom-naphthazarin zur Inaktivierung von 1 Mol. Carboxylase erforderlich.

*p*-Benzochinon war als wirksamer Hemmstoff mehrerer Fermentsysteme bekannt<sup>1)</sup>. In einer früheren Arbeit<sup>2)</sup> wurde die Hemmung von Hefecarboxylase durch Chinon festgestellt. Wegen der biologischen Bedeutung, die die Chinone in jüngster Zeit gewonnen haben—Benzochinone als bakteriostatische<sup>3)</sup> 4), spermicide<sup>5)</sup> und krebserregende<sup>6)</sup> Wirkstoffe, Naphthochinone als

1) L. Hellermann u. M. E. Perkins, Journ. biol. Chem. **107**, 241 [1934]; E. S. G. Barron, Journ. biol. Chem. **113**, 695 [1936]; W. Franke, A. **555**, 111 (S. 122) [1944]; Ztschr. physiol. Chem. **281**, 162 [1944]; A. V. Blagoveschensky u. T. A. Sorokina, Bull. Biol. Méd. exp. URSS **4**, 176 [1937], zit. nach C. **1938** II, 869; s. auch Ann. **13**, **14**, 15 in Fußn. 2.

2) R. Kuhn, u. H. Beinert, B **76**, 904 [1943].

3) S. Hilpert, Biochem. Ztschr. **166**, 71 [1925].

4) W. K. Anslow u. H. Raistrick, Biochem. Journ. **32**, 687 [1938]; A. E. Oxford, Chem. Industr. **61**, 189 [1942].

5) J. M. Gulland, Biochem. Journ. **26**, 32 [1932]; H. A. Lardy u. P. H. Phillips, Journ. biol. Chem. **148**, 333 u. 343 [1943].

6) N. Takizawa, Proceed. Jmp. Acad. (Tokyo) **16**, 309 [1940]; Gann, Japan. Journ. Cancer Res. **34**, 158 [1940].

Vitamin-K-aktive Stoffe<sup>7)</sup> und natürliche Pigmente<sup>8)</sup>, Anthrachinone als Naturstoffe und Antagonisten natürlicher Bakteriengifte<sup>9)</sup>—, wurde eine Reihe von Chinonen und verwandten Verbindungen auf ihr Hemmungsvermögen gegenüber Carboxylase untersucht, um der Frage nach der Spezifität und dem Mechanismus dieser Erscheinung näher zu kommen. Die zweite Frage wird Gegenstand einer nachfolgenden Arbeit sein; es soll nur vorausgeschickt werden, daß die hemmende Wirkung sehr wahrscheinlich auf einer Reaktion mit einer oder mehreren SH-Gruppen des Fermentproteins beruht.

#### Methodik.

Die verwendeten Carboxylasepräparate waren aus Unterhefe der Stuttgarter Hofbräu A.-G. und der Brauerei Kleinlein A.-G., Heidelberg, nach D. E. Green, D. Herbert und V. Subrahmanyam<sup>10)</sup> hergestellt und enthielten 1.46 bis 1.67 Einheiten nach Green in 1 ccm. Die Manometergefäße wurden mit 0.3 ccm Fermentsuspension (entspr. 0.44 bis 0.5 Einheiten und 72—82  $\gamma$  Protein nach Green<sup>11)</sup>), 0.2 ccm 0.5-mol. Citratpuffer vom pH 6.0 und 1.2 ccm Wasser oder Hemmstofflösung<sup>12)</sup> im Hauptraum und 0.3 ccm 0.15-mol. Natriumpyruvatlösung (enthaltend 5 mg in 0.3 ccm) in der Retorte gefüllt. Im Gasraum war Luft. Versuchstemperatur 30°. Ohne längere Incubation wurde nach einem Temperatenausgleich von 10 Min. gekippt und nach 3, 6 und 9 Min. abgelesen. Der besseren Reproduzierbarkeit wegen wurde die Gasentwicklung vom Beginn der 4. bis Ende der 9. Min. als Maß der Aktivität gewählt.

#### Ergebnisse.

Die Ergebnisse sind in der Tafel zusammengestellt. Die Stoffe wurden je nach ihrer Löslichkeit und Wirksamkeit bei verschiedenen Konzentrationen geprüft, von denen eine höhere jeweils das Vierfache der vorhergehenden betrug. Wenn aus besonderen Gründen davon abgegangen wurde, ist bei der Angabe der Hemmung auf eine Fußnote verwiesen. Bei mehreren Stoffen finden sich Hinweise auf Arbeiten, in denen bereits über eine Wirkung dieses Stoffes auf Carboxylase oder verwandte Fermente berichtet wird, und die oftmals die Einbeziehung des betreffenden Stoffes in unsere Untersuchung veranlaßt haben.

Für die Überlassung zahlreicher Präparate der Naphthochinongruppe sind wir Hrn. Doz. Dr. K. Wallenfels und Hrn. Prof. Dr. F. Weygand zu Dank verpflichtet.

<sup>7)</sup> Dazu vergl. auch F. Bernheim u. M. L. C. Bernheim, Journ. biol. Chem. **134**, 457 [1940]; M. Kiese, Biochem. Ztschr. **316**, 264 [1944]: Naphthochinone als Katalysatoren der Hämoglobinreduktion.

<sup>8)</sup> Z. B. R. Kuhn u. K. Wallenfels, B. **72**, 1453 [1939].

<sup>9)</sup> H. McIlvain, Biochem. Journ. **37**, 265 [1943].

<sup>10)</sup> Journ. biol. Chem. **138**, 327 [1941].

<sup>11)</sup> Eine eigene Bestimmung ergab 96  $\gamma$  Protein für 0.3 ccm.

<sup>12)</sup> Bei schwer löslichen Stoffen wurde statt Wasser 5-proz. Alkohol verwendet, der die Fermentaktivität nicht merklich beeinflußt.

## Tafel.

Hemmung der CO<sub>2</sub>-Entwicklung (%)  
aus Brenztraubensäure.Die Konzentration der Hemmstoffe ist in 10<sup>-6</sup> Mol/l angegeben.

Nr.	Hemmstoff	2.35	9.4	37.5	150
1)	<i>p</i> -Benzochinon	22	60	85	95
2)	Methyl- <i>p</i> -benzochinon (Toluchinon)	—	55	83	—
3)	Acetamino- <i>p</i> -benzochinon	—	—	70	92
4)	2.5-Dimethyl- <i>p</i> -benzochinon ( <i>p</i> -Xylochinon)	—	—	43	—
5)	2.6-Dimethoxy- <i>p</i> -benzochinon <sup>4)</sup>	—	—	—	41
6)	6-Methyl-2-oxy-3-methoxy- <i>p</i> -benzochinon <sup>4)</sup> ( <i>Fumigatin</i> )	—	—	14	21
7)	Tetramethyl- <i>p</i> -benzochinon (Durochinon)	—	—	—	22
8)	Tetrachlor- <i>p</i> -benzochinon (Chloranil) <sup>3)</sup>	—	81	94	—
9)	Tetraoxy- <i>p</i> -benzochinon (Dinatriumsalz)	—	—	7	—
10)	2.5-Dioxy-3.6-dinitro- <i>p</i> -benzochinon (Dikaliumsalz, nitranilsaures Kalium)	—	—	0	—
11)	Naphthochinon-(1.4)	—	65	89	96
12)	2-Methyl-naphthochinon-(1.4) (Vitamin K <sub>3</sub> )	—	—	32	68
13)	2-Äthyl-naphthochinon-(1.4)	—	—	—	77
14)	2-Chlor-naphthochinon-(1.4)	—	89	94	97
15)	2-Brom-naphthochinon-(1.4)	—	87	95	—
16)	2-Brom-3-äthyl-naphthochinon-(1.4)	—	74	87	—
17)	2-Oxy-naphthochinon-(1.4) ( <i>Lawson</i> )	—	—	—	5
18)	2-Methoxy-naphthochinon-(1.4)	—	—	—	37
19)	3-Methyl-2-oxy-naphthochinon-(1.4) ( <i>Phthiocol</i> )	—	—	—	4
20)	3-Methyl-2-methoxy-naphthochinon-(1.4)	—	—	—	56
21)	2-Oxy-3-acetyl-naphthochinon-(1.4)	—	—	—	10
22)	5-Oxy-naphthochinon-(1.4) ( <i>Juglon</i> )	—	82	92	96
23)	5.8-Dioxy-naphthochinon-(1.4) (Naphthazarin)	—	82	93	97
24)	2-Methyl-5.8-dioxy-naphthochinon-(1.4)	59	85	95	—
25)	2-Brom-5.8-dioxy-naphthochinon-(1.4)	72	93	98	—
26)	3-[2-Methyl-5-oxy-penten-(2)-yl]-5.8-dioxy-naphthochinon-(1.4) ( <i>Shikonin</i> )	—	83	92	—
27)	2.3-Dioxy-naphthochinon-(1.4) (Isonaphthazarin)	—	—	—	27
28)	2-Oxy-3-methoxy-naphthochinon-(1.4)	—	—	—	7
29)	2.3-Dimethoxy-naphthochinon-(1.4)	—	3	16	—
30)	2.5.8-Trioxy-naphthochinon-(1.4) (Naphthopurpurin)	—	—	13	33
31)	5.8-Dioxy-2-methoxy-naphthochinon-(1.4)	—	51	80	89

Nr.	Hemmstoff	9.4	37.5	150
32)	3-Äthyl-2.5.8-trioxy-naphthochinon-(1.4) (Äthyl-naphthopurpurin)	—	17	35
33)	3-Äthyl-5.8-dioxy-2-methoxy-naphthochinon-(1.4)	78	90	—
34)	2.3.5.8-Tetraoxy-naphthochinon-(1.4)	—	18	30
35)	5.8-Dioxy-2.3-dimethoxy-naphthochinon-(1.4)	64	86	—
36)	2.3-Dioxy-5.8-dimethoxy-naphthochinon-(1.4)	—	16	—
37)	2-Äthyl-5.7.8-trioxy-3-methoxy-naphthochinon-(1.4)	—	58	82
38)	2-Äthyl-3.5.6.7.8-pentaoxy-naphthochinon-(1.4) (Echinochrom A)	—	—	25
39)	2-Äthyl-5.8-dioxy-3.6.7-trimethoxy-naphthochinon-(1.4)	—	76	—
40)	Naphthochinon-(1.2)	67	89	96
41)	3-Methyl-naphthochinon-(1.2)	—	90	96
42)	3-Brom-naphthochinon-(1.2)	84	92	—
43)	Naphthochinon-(1.2)-sulfonsäure-(4) (Natriumsalz) <sup>13)</sup>	—	37	81
44)	1.5-Dichlor-naphthochinon-(2.6) (Dichlor-amphi-naphthochinon)	21	46	—
45)	Anthrachinon	2	—	—
46)	1.2-Dioxy-anthrachinon (Alizarin)	—	11	—
47)	1.4-Dioxy-anthrachinon (Chinizarin)	9	—	—
48)	1.8-Dioxy-anthrachinon (Istizin)	12	—	—
49)	1.2.5.8-Tetraoxy-anthrachinon (Alizarinbordeaux)	0	—	—
50)	? -Brom-1.2.5.8-tetraoxy-anthrachinon <sup>14)</sup>	0	—	—
51)	Anthrachinon-sulfonsäure-(2) (Natriumsalz)	—	—	25
52)	Anthrachinon-disulfonsäure-(1.5) (Natriumsalz)	—	—	9
53)	Anthrachinon-disulfonsäure-(2.7) (Natriumsalz)	—	—	4
54)	1.2-Dioxy-anthrachinon-sulfonsäure-(3) (Natriumsalz)	—	—	9
55)	Chinoxalin-di-N-oxyd*)	—	—	0
56)	Phenazin-di-N-oxyd*)	4	—	—
57)	(β-Amino-β-carboxyäthyl)-mercapto-p-benzochinon <sup>15)</sup> (S-Cysteino-p-benzochinon)	—	0	—
58)	7-Oxo-3.7-dihydro-benzo-parathiazin-carbonsäure-(3)- äthylester <sup>15)</sup>	0	—	—

\*) Diese Verbindungen wurden wegen ihrer sterischen Verwandtschaft und des antagonistischen Verhaltens gegen Naphthochinone und Anthrachinone (vergl. Fußn. 9) untersucht.

<sup>13)</sup> Vergl. L. Michaelis, V. Moragues-Gonzalez u. C. V. Smythe, *Enzymol.* 3, 242 [1937].

<sup>14)</sup> Erhalten durch Bromieren einer alkohol. Suspension von Tetraoxyanthrachinon; aus Eisessig kristallisiert.

Analyse: C<sub>14</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>Br (351). Ber. Br 22.77. Gef. Br 22.52, 22.64.

<sup>15)</sup> R. Kuhn u. H. Beinert, *B* 77, 606 [1944]; die durch Verseifen mit kalter 2 n NaOH aus dem beschriebenen 7-Oxo-3.7-dihydro-benzo-parathiazin-carbonsäure-(3)-äthylester entstehende Carbonsäure hatte auch nach 2-maligem Umfällen mit HCl aus NH<sub>3</sub>-Lösg. die unveränderte analytische Zusammensetzung eines um H<sub>2</sub>O reicheren Produkts, als zu erwarten war, also die des einfach durch Cystein substituierten Chinons, des S-Cysteino-chinons.

Analyse: C<sub>14</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>NS (227.1). Ber. C 47.55, H 3.99, N 6.17, S 14.11.

Nach 1-maligem Umfällen Gef. C 47.80, H 3.64, N 6.12, S 14.10.

Nach 2-maligem Umfällen Gef. C 47.62, H 3.77, N 6.16, S 13.67.

Das Ergebnis der Äthoxylbestimmung war negativ.

Nr.	Hemmstoff	2.35	9.4	37.5	150	600
59)	Maleinsäure <sup>16)</sup>	—	—	—	—	0**)
60)	Alloxan <sup>17)</sup>	—	—	—	—	10***)
61)	$\alpha,\beta$ -Diacetyl-äthylen	—	—	8	25	46
62)	$\alpha,\beta$ -Dibenzoyl-äthylen	—	16	32	—	—
63)	$\alpha,\beta$ -Dibenzoyl-äthylen-dibromid	—	27	36†)	—	—
64)	$\alpha,\beta$ -Distearoyl-äthylen	—	0	—	—	—
65)	Diacetyl	—	—	—	—	0††)
66)	Acetonylacetone	—	—	—	—	0
67)	Glyoxylsäure <sup>18)</sup>	—	—	—	40	72
68)	Glyoxylsäureäthylester-diäthylacetal	—	—	—	—	35
69)	Oxalsäure (Ammoniumsalz)	—	—	—	—	0
70)	Glyoxal	—	—	—	—	0
71)	Methylglyoxal <sup>19)</sup>	—	—	—	—	0
72)	Glyoxal-semi-diäthylacetal	—	—	—	—	0
73)	Acetaldehyd <sup>10)</sup>	—	—	—	17†††)	42††††)
74)	Dehydroascorbinsäure <sup>20)</sup>	—	—	—	—	0
<hr/>						
75)	Parasorbinsäure	—	—	—	—	0
76)	Cumarin	—	—	0	—	—
77)	Patulin <sup>21)</sup>	—	—	—	—	0
78)	Citrinin <sup>22)</sup>	—	—	—	7	—
<hr/>						
79)	Hg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> <sup>10)</sup> <sup>23)</sup>	20	82	88	95	—
80)	CuSO <sub>4</sub> (mit Citratpuffer) <sup>10)</sup> <sup>23)</sup> <sup>24)</sup>	—	—	—	—	16
	CuSO <sub>4</sub> (mit Phosphatpuffer) <sup>24)</sup>	—	—	35	55	—
81)	Jod <sup>25)</sup>	—	—	78	96 <sup>†)</sup>	—

\*\* ) Für  $2400 \times 10^{-6}$  Mol/l.      \*\*\* ) Für  $1500 \times 10^{-6}$  Mol/l.

† ) Für  $18.7 \times 10^{-6}$  Mol/l.      †† ) Für  $7000 \times 10^{-6}$  Mol/l.

††† ) Für  $1500 \times 10^{-6}$  Mol/l.      †††† ) Für  $6000 \times 10^{-6}$  Mol/l.      + ) Für  $75 \times 10^{-6}$  Mol/l.

<sup>16)</sup> Vergl. E. J. Morgan u. E. Friedmann, Biochem. Journ. **32**, 733, 862, 2296 [1938].

<sup>17)</sup> Auch Alloxan reagiert mit SH-Verbindungen: A. Purr, Biochem. Journ. **29**, 5 [1935]; L. Rapkine u. P. Trpinac, Compt. rend. Soc. Biol. **130**, 1516 [1939]; F. G. Hopkins, E. J. Morgan u. C. Lutwak-Mann, Biochem. Journ. **32**, 1829 [1938]; R. Labes, Arch. exper. Pathol. u. Pharmakol. **156**, 226 [1930].

<sup>18)</sup> Vergl. A. Kleinzeller, Biochem. Journ. **37**, 674 [1943].

<sup>19)</sup> Vergl. A. Purr, Biochem. Journ. **29**, 5 [1935].

<sup>20)</sup> Vergl. J. H. Quastel, Nature **152**, 215 [1943].

<sup>21)</sup> J. H. Birkinshaw, A. Bracken, S. E. Michael u. H. Raistrick, Lancet **2**, 625 [1943].

<sup>22)</sup> A. C. Hetherington u. H. Raistrick, Phil. Trans. B. **220**, 269 [1941].

<sup>23)</sup> K. Lohmann u. A. J. Kossel, Naturwiss. **27**, 595 [1939]; A. J. Kossel, Ztschr. physiol. Chem. **276**, 251 [1942].

<sup>24)</sup> J. L. Melnick u. K. G. Stern, Enzymol. **8**, 129 [1940]; diese Autoren stellten fest, daß Citrat die hemmende Wirkung von Cu-Ionen abschwächt.

<sup>25)</sup> Vergl. L. Hellermann u. M. E. Perkins, Journ. biol. Chem. **107**, 241 [1934].

Nr.	Hemmstoff	2.35	9.4	37.5	150	600
82)	<i>p</i> -Chlor-mercuri-benzoesäure <sup>26)</sup>	15	89	91	—	—
83)	<i>o</i> -Jodoso-benzoesäure <sup>26)</sup>	—	4	5×)	13	—
84)	Porphyrintdin <sup>26)</sup> 27)	—	—	6×)	21××)	—
85)	Thionin <sup>28)</sup> 29)	—	—	50	—	—
86)	Methylenblau <sup>28)</sup> 29) 30)	—	—	41	—	—
87)	Toluylenblau <sup>31)</sup>	—	—	0	—	—
88)	2,6-Dichlor-phenol-indophenol <sup>31)</sup>	—	—	62	86	—
89)	<i>p</i> -Amino-phenol	—	—	—	10	23
90)	<i>p</i> -Benzochinon-imin <sup>32)</sup>	—	—	—	30	—
91)	1-Amino-naphthol-(2), HCl	—	—	—	—	40
92)	1-Amino-3-brom-naphthol-(2), HCl <sup>33)</sup>	—	—	86	92	96
93)	2,4-Dinitro-phenol <sup>29)</sup>	—	—	5	—	—
94)	8-Oxy-chinolin	—	—	—	0	—
95)	Cystin	—	—	—	—	0
96)	Aneurindisulfid	—	—	—	0	—
97)	$\beta$ . $\beta$ -Dichlor-diäthyl-sulfon <sup>34)</sup>	—	—	—	—	0
98)	$\beta$ . $\beta$ -Dichlor-diäthyl-sulfoxyd	—	—	—	—	0
99)	$\beta$ . $\beta$ -Dichlor-diäthyl-sulfid	—	—	—	—	0

×) Für  $18.7 \times 10^{-6}$  Mol/l.

××) Für  $75 \times 10^{-6}$  Mol/l: Die Molarität wurde zum Vergleich halb so groß wie üblich gewählt, da Jodosobenzoesäure und Porphyrintdin gegenüber SH-Gruppen 2 Oxydationsäquivalente besitzen.

Orientierende Versuche ergaben, daß auch die Carboxylase *tierischer* Gewebe<sup>35)</sup> durch Chinon und in stärkerem Maße durch 2-Chlor-naphthochinon-(1,4) gehemmt wird.

<sup>26)</sup> Vergl. L. Hellermann, F. P. Chinard u. V. R. Deitz, Journ. biol. Chem. **147**, 443 [1943].

<sup>27)</sup> R. Kuhn u. P. Desnuelle, Ztschr. physiol. Chem. **251**, 14 [1938]; J. P. Greenstein, Journ. biol. Chem. **125**, 501 [1938]; **128**, 233 [1939]; **130**, 519 [1939]; **133**, 397 [1940].

<sup>28)</sup> Vergl. L. Michaelis u. C. V. Smythe, Journ. biol. Chem. **113**, 717 [1936].

<sup>29)</sup> Vergl. L. Massart u. L. Vandendriessche, Enzymol. **10**, 244 [1941/42]; L. Vandendriessche, Enzymol. **10**, 69 [1941/42].

<sup>30)</sup> F. Cedrangolo u. E. Adler, Enzymol. **7**, 297 [1939].

<sup>31)</sup> Vergl. E. S. G. Barron, Journ. biol. Chem. **113**, 695 [1936].

<sup>32)</sup> Vergl. F. Bernheim u. M. L. C. Bernheim, Journ. biol. Chem. **123**, 307 [1938]; M. B. Blauch, F. C. Koch u. M. E. Hanke, Journ. biol. Chem. **130**, 471 [1939]; *p*-Amino-phenol wurde nach Angabe dieser Autoren vor Zusatz zum Ferment oxydiert.

<sup>33)</sup> Vergl. E. W. Rockwood u. W. J. Husa, Journ. Amer. chem. Soc. **45**, 2678 [1923].

<sup>34)</sup> R. A. Peters, Nature **138**, 327 [1936]; Th. Bersin, Biochem. Ztschr. **248**, 3 [1932].

<sup>35)</sup> D. E. Green, W. W. Westerfeld, B. Vennesland u. W. E. Knox, Journ. biol. Chem. **140**, 683 [1941].

## Besprechung der Versuche.

Benzochinone: Toluchinon ist etwa gleich wirksam wie Chinon; die Einführung weiterer Methylgruppen (Xylochinon, Durochinon) setzt die Aktivität herab. Eintritt von Hydroxylgruppen macht sich im gleichen Sinne noch stärker bemerkbar (Fumigatin, Nitransilsäure, Tetraoxychinon). Von den geprüften Derivaten ist nur Chloranil wirksamer als *p*-Benzochinon.

Naphthochinone: Naphthochinon-(1.2) und Naphthochinon-(1.4) lassen keinen Unterschied erkennen. Ihr Hemmungsvermögen übertrifft das des *p*-Benzochinons nur wenig. Unter den zahlreichen Naphthochinonderivaten, die untersucht wurden, finden sich die aktivsten bisher bekannten Verbindungen. An der Spitze steht 2-Brom-naphthazarin; diesem kommen 2-Methyl-naphthazarin sowie 2-Chlor- und 2-Brom-naphthochinon am nächsten. Auch 2-Methyl-naphthochinon-(1.4) (Vitamin K<sub>3</sub>) hemmt beachtlich; es fällt auf, daß die 3-ständige Methylgruppe nur beim Naphthochinon-(1.4) abschwächend wirkt, nicht beim Naphthochinon-(1.2)<sup>36</sup>.

Hydroxylgruppen in 5-Stellung (Juglon) oder in 5.8-Stellung (Naphthazarin) erhöhen die Wirksamkeit, Hydroxylgruppen in 2- bzw. 2.3-Stellung dagegen setzen sie herab (Lawson, Phthiocol, Echinochrom u. a.). Veräthert man die zuletzt genannten Hydroxyle, so nimmt das Hemmungsvermögen wieder zu.

Anthrachinone: Anthrachinon ist praktisch unwirksam; auch die geprüften Derivate hemmen nicht oder nur wenig.

Aliphatische Dicarbonylverbindungen: Maleinsäure, die auf Succinodehydrase und Papain hemmend wirkt<sup>16</sup>), ist bei Carboxylase ohne Einfluß (bis  $2.4 \times 10^{-3}$  Mol/l). Von weiteren Verbindungen, die in ihrem Molekül die für Chinone charakteristische Gruppierung  $-\text{CO} \cdot \text{CH} : \text{CH} \cdot \text{CO}-$  enthalten, aber aliphatisch gebaut sind, erscheint das  $\alpha$ . $\beta$ -Diacetyl-äthylen bemerkenswert. Übertroffen wird Diacetyläthylen<sup>37</sup>) von *trans*- $\alpha$ . $\beta$ -Dibenzoyl-äthylen, das Carboxylase ebenso stark wie CuSO<sub>4</sub> hemmt. Beim  $\alpha$ . $\beta$ -Dibenzoyl-äthylen-dibromid kommt zur Erklärung des Hemmungsvermögens an Stelle von Addition an eine SH-Gruppe des Ferments eine Kondensation unter Austritt von HBr in Betracht<sup>38</sup>). Diketone, denen die additionsfähige Doppelbindung fehlt (Diacetyl, Acetonylaceton) sind unwirksam. Bei der Glyoxylsäure wird man an eine Verdrängung des Substrats (Brenztraubensäure) denken<sup>16</sup>).

Naturstoffe (in der Tafel kursiv gedruckt): Unter diesen heben sich, soweit geprüft, zwei Naphthochinone hervor, nämlich Shikonin und Juglon. Beide kommen dem 2-Brom-naphthazarin nahe. Zwei Blastokoline, Parasorbinsäure und Cumarin, waren unwirksam.

Weitere Verbindungen: Bekannt als Hemmstoffe der Carboxylase und als reaktionsfähig mit SH-Verbindungen waren Hg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> und CuSO<sub>4</sub><sup>10</sup>)<sup>23</sup>)<sup>24</sup>) für die nach eigenen Messungen Werte in die Tafel mit aufgenommen sind. Auch

<sup>36</sup>) Vergl. L. F. Fieser u. A. M. Seligmann, Journ. Amer. chem. Soc. **56**, 2690 [1934].

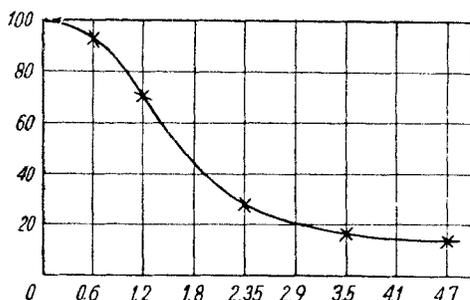
<sup>37</sup>) UV-bestrahlte Lösungen verhielten sich wie unbestrahlte.

<sup>38</sup>) Vergl. die von J. L. Wood u. L. F. Fieser durchgeführte Kondensation von 10-Chlormethyl-1.2-benz-anthracen mit Cystein, Journ. Amer. chem. Soc. **62**, 2674 [1940].

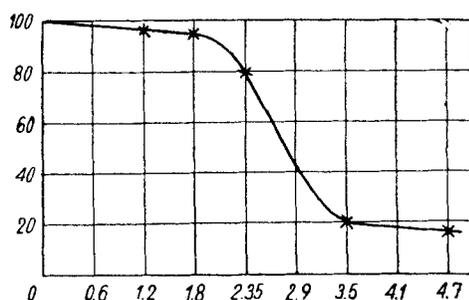
Jod hemmt stark. *p*-Chlor-mercuri-benzoesäure ist wie bei Urease<sup>26)</sup> stark, *o*-Jodoso-benzoesäure und Porphyrindin sind wie dort kaum wirksam. Beachtlich ist die Hemmung der Carboxylase durch Thionin, Methylenblau<sup>28)</sup> <sup>29)</sup> <sup>30)</sup> und durch 2,6-Dichlor-phenol-indophenol<sup>31)</sup>.

Die Reduktions-Oxydations-Potentiale von Chinonen sind schon Gegenstand zahlreicher Arbeiten gewesen<sup>39)</sup>. Insbesondere haben K. Wallenfels und W. Möhle Potentialmessungen eines großen Teils der von uns geprüften Naphthochinone durchgeführt. J. E. Page und F. A. Robinson<sup>40)</sup> setzten bakteriostatische Wirksamkeit und Redox-Potential von Chinonen in Beziehung. Obwohl ihre Untersuchungen nur wenige Vertreter dieser Stoffklasse umfassen, wird man — im günstigsten Falle — ihr Ergebnis auch auf die größere Zahl der von uns geprüften Chinone erweitern dürfen: "We failed to find a direct relationship connecting the reduction potential of these quinones with their bacteriostatic activity . . . but observed that . . . the reduction potentials of all the active quinones examined to date fell between certain limits".

Die absolute Wirksamkeit der Hemmstoffe läßt sich aus den für die Aktivität der reinen Carboxylase bekannten Zahlen berechnen.



Abbild. 1. Hemmung der Carboxylase durch 2-Brom-naphthazarin. Abszisse: Konzentration des Hemmstoffs in  $10^{-6}$  Mol/l; Ordinate: Aktivität in % (vergl. S. 102).



Abbild. 2. Hemmung der Carboxylase durch Quecksilber(II)-chlorid. Abszisse: Konzentration des Hemmstoffs in  $10^{-6}$  Mol/l; Ordinate: Aktivität in % (vergl. S. 102).

Vorausgeschickt sei, daß selbst bei Hemmstoff-Konzentrationen, die noch nicht voll inaktivieren, in der Lösung noch frei vorhandener und zu weiterer Einwirkung fähiger Hemmstoff nachgewiesen werden kann.

Beispiel: Zu 0.6 ccm Fermentsuspension wurden 0.2 ccm 0.5-mol. Citratpuffer vom  $p_H$  6.0 und 0.6 ccm  $2.35 \times 10^{-5}$  mol. 2-Brom-naphthazarin-Lösung zugegeben; diese Hemmstoffmenge ist zu einer 80—85-proz. Hemmung notwendig. Nach der üblichen Incubationszeit von 10 Min. bei 30° wurden 0.3 ccm frische Fermentsuspension zugegeben. Unter Berücksichtigung der Restaktivität des vergifteten Ferments (15—20%) betrug die Aktivität des frisch zugesetzten Ferments nach weiterer Incubation von 10 Min. nur noch 50%. Zu einer 50-proz. Hemmung sind aber nach Abbild. 1 etwa  $1.7 \times 10^{-6}$  Mol/l oder die absolute Menge von  $3.4 \times 10^{-6}$  Millimol notwendig. Die ursprüngliche Hemmstoffmenge

<sup>39)</sup> Vergl. K. Wallenfels u. W. Möhle, B. 76, 924 [1943] u. weitere Literatur ebendort.

<sup>40)</sup> Biochem. Journ. 37, Proceed. V. [1943]; Journ. Chem. Soc. London 1943, 133.

betrug  $14 \times 10^{-6}$  Millimol. Demnach bleibt also etwa  $\frac{1}{4}$  des Hemmstoffes frei. Entsprechende Versuche zeigten, daß das gleiche bei 2-Chlor-naphthochinon und mehr noch bei dem weniger spezifischen Benzochinon der Fall ist. Jod dagegen verschwindet vollständig aus der Lösung. In einem entsprechenden Versuch mit  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  konnten nach Incubation mit dem Ferment noch 10% bis 20% dieses Hemmstoffes nachgewiesen werden.

D. E. Green, D. Herbert und V. Subrahmanyan<sup>40)</sup> haben die Carboxylaseeinheit definiert als die Fermentmenge, die unter den angegebenen Bedingungen die Entwicklung von 100 cmm  $\text{CO}_2$  in 3 Min. bei  $30^\circ$  katalysiert. Die reinste Fermentfraktion dieser Autoren enthielt 165  $\gamma$  Protein pro Einheit. Der Anteil der Cocarboxylase am Protein betrug 0.46% oder 0.76  $\gamma$  pro Einheit. Ein Mol Cocarboxylase  $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}_8\text{N}_4\text{ClSP}_2$  entspricht 479 g; 0.76  $\gamma$  entsprechen dann  $1.6 \times 10^{-6}$  Millimol Cocarboxylase.

In unseren Ansätzen befanden sich jeweils 0.3 ccm Fermentsuspension zu 0.44 bis 0.5 Einheiten; dem entsprechen 0.7 bis  $0.8 \times 10^{-6}$  Millimol Cocarboxylase oder auch Carboxylase.

In einem Ansatz von 2 ccm Gesamtvolumen, enthaltend 0.3 ccm Fermentsuspension, setzt 2-Brom-naphthazarin in einer Konzentration von  $0.6 \times 10^{-6}$  Mol/l die Aktivität um 7% herab (vergl. Abbild. 1), in einer Konzentration von  $3.5 \times 10^{-6}$  Mol/l um 83%. In dem Konzentrationsbereich von  $0.6 \times 10^{-6}$  bis  $3.5 \times 10^{-6}$  Mol/l gehen demnach 76% der Aktivität verloren. Dem entspricht in einem Ansatz von 2 ccm die absol. Menge von  $2 \times 2.9 \times 10^{-6} = 5.8 \times 10^{-6}$  Millimol 2-Brom-naphthazarin. Diese vernichten  $\frac{3}{4}$  der Aktivität, machen also rund  $0.75 \times 0.7$  bis  $0.75 \times 0.8 \times 10^{-6}$  Millimol = 0.53 bis  $0.6 \times 10^{-6}$  Millimol Carboxylase unwirksam. Die oben mitgeteilten Versuche zeigen aber, daß selbst bei 2-Brom-naphthazarin-Konzentrationen, die nicht voll hemmen, noch Hemmstoff frei in der Lösung vorhanden ist, der weiteres Ferment zu inaktivieren vermag, und zwar etwa der vierte Teil des ursprünglich vorhandenen. Somit genügen  $4 \times 10^{-6}$  Millimol zur Inaktivierung von 0.5 bis  $0.6 \times 10^{-6}$  Millimolen, d.h. auf 1 Carboxylasemolekül rund 7 Moleküle 2-Brom-naphthazarin. Bei der Inaktivierung durch Quecksilber(II)-chlorid findet man auf gleichem Wege ein Verhältnis von etwa 1 : 6.

Die von F. Kubowitz und W. Lüttgens<sup>41)</sup> angegebenen Daten führen zu einem ähnlichen Ergebnis: Nach diesen Autoren enthalten 75000 g Protein der reinsten Fraktion 1 Mol Cocarboxylase. Die Proteinbestimmung an einem von uns verwendeten Präparat ergab 96  $\gamma$  Protein je 0.3 ccm Fermentsuspension und Testansatz von 2 ccm entsprechend  $1.3 \times 10^{-6}$  Millimol Cocarboxylase, während wir nach Green 0.7 bis  $0.8 \times 10^{-6}$  Millimol fanden<sup>42)</sup>. Dieser Unterschied ist wohl so zu erklären, daß unser Präparat nicht so rein war und mehr Protein enthielt, als das von Kubowitz und Lüttgens zu analytischen Untersuchungen gereinigte.

<sup>41)</sup> Biochem. Ztschr. **307**, 170 [1940].

<sup>42)</sup> Die von Green und Mitarbeitern untersuchten Carboxylasepräparate waren aus Oberhefe hergestellt, die unsrigen aus Unterhefe. Kubowitz und Lüttgens verwendeten vermutlich auch Unterhefe.